

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 9/16, C07H 19/20, 19/10, A61K 31/70, C12Q 1/44</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/15234</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>23. Mai 1996 (23.05.96)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP95/04414</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, HU, JP, KR, KZ, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 9. November 1995 (09.11.95)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: P 44 40 472.7 12. November 1994 (12.11.94) DE 195 18 278.2 18. Mai 1995 (18.05.95) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE];, D-68298 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERRMANN, Dieter [DE/DE]; An der Neckarspitze 13, D-69115 Heidelberg (DE). OPITZ, Hans-Georg [DE/DE]; Im Netztal 46, D-69469 Weinheim (DE). ZILCH, Harald [DE/DE]; Alsenweg 24, D-68305 Mannheim (DE).			
(74) Anwälte: MINK, Reinhold usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).			

(54) Title: LIPID-SPLITTING ENZYME

(54) Bezeichnung: LIPIDSPALTENDES ENZYM

(57) Abstract

A membranous enzyme not yet described in the state-of-the-art can be extracted from cellular membrane fractions of blood leukocytes or monocytes/macrophages. Also disclosed is the use of substrates of this enzyme to prepare medicaments that contain these substrates as pharmaceutical active substance. These medicaments are useful to direct pharmacologically active substances to target cells and to enrich target cells with said substances. Also disclosed are in-vitro research systems containing this enzyme used to detect other substrates of this enzyme.

(57) Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein bisher nicht beschriebenes membranständiges Enzym, das aus Zellmembranfraktionen von Blutleukozyten oder Monozyten/Makrophagen isoliert werden kann. Außerdem betrifft die Erfindung die Verwendung von Substraten dieses Enzyms zur Herstellung von Arzneimitteln, wobei die Arzneimittel diese Substrate als pharmazeutischen Wirkstoff enthalten. Die Arzneimittel eignen sich zur gezielten Freisetzung und Anreicherung von pharmakologisch aktiven Substanzen in entsprechenden Zielzellen. Gegenstand der Erfindung sind ferner In-vitro-Untersuchungssysteme, die dieses Enzym enthalten, zur Auffindung von weiteren Substraten dieses Enzyms.

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Oesterreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## 5 LIPIDSPALTENDES ENZYM

Der lipidspaltende Enzymkomplex (Lipid-Cleavage-Enzym; LCE) und seine Analoga, Gegenstand der vorliegenden Erfindung, sind bisher nicht beschriebene, membranständige Enzyme, die z. B. aus Zellmembranfraktionen von humanen peripheren Blutleukozyten 10 oder humanen Makrophagen isoliert werden können, und die Konjugate von pharmakologisch aktiven Substanzen, die an ein lipidartiges Trägermolekül gebunden sind, unter Freisetzung der pharmakologisch aktiven Substanz oder dessen Monophosphat spalten. Außerdem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Konjugate, die als Substrate dieses Enzymkomplexes dienen, zur Herstellung von Arzneimitteln, wobei die Arzneimittel 15 diese Konjugate als pharmazeutischen Wirkstoff enthalten. Die Arzneimittel eignen sich zur gezielten Freisetzung und Anreicherung von pharmakologisch aktiven Substanzen in entsprechenden Zielzellen. Gegenstand der Erfindung sind ferner In-vitro-Untersuchungssysteme, die diesen Enzymkomplex enthalten, zur Auffindung von weiteren Substraten dieses Enzymkomplexes, sowie Untersuchungssysteme zur Auffindung von 20 LCE-Analoga. Unter LCE wird sowohl der Enzymkomplex, isoliertes Enzym und mögliche Isoenzyme verstanden.

Die Therapie bösartiger Neoplasien (z. B. Karzinome, Sarkome, Hämblastosen, hämatologische Neoplasien), entzündlicher Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen sowie von durch Viren oder Retroviren hervorgerufenen Erkrankungen, wie beispielsweise 25 von AIDS, ARC (AIDS related complex), Cytomegalie, Herpes oder Hepatitis, ist neben der unzureichenden Wirksamkeit der eingesetzten therapeutischen Wirkstoffe häufig mit deren extremen Nebenwirkungen verbunden. Dieser Effekt ist mit der zu geringen In-vivo-Selektivität bzw. der eingeschränkten therapeutischen Breite der eingesetzten pharmakologisch aktiven Substanzen zu erklären. Die günstigen pharmakologischen In-30 vitro-Eigenschaften der pharmakologisch aktiven Substanzen sind oft nicht auf die In-vivo-Verhältnisse übertragbar.

Seit Jahren versucht man deshalb durch Modifizierung der chemischen Struktur von pharmakologisch aktiven Substanzen neue Substanzen zur Verfügung zu stellen, die verbesserte Eigenschaften hinsichtlich der therapeutischen Breite aufweisen. Ferner werden oft neue pharmazeutische Darreichungsformen mit dem Ziel entwickelt, die aktiven Substanzen gezielt an ihren Wirkungsort zu transportieren, an dem sie ihre therapeutische Wirkung entfalten sollen. Dabei soll insbesondere die unerwünschte Wechselwirkung mit gesunden Zellen vermieden werden. Im Falle von Tumorzellen, die entsprechende Oberflächenantigene besitzen, wurden beispielsweise Antikörper hergestellt, die diese speziellen Oberflächenantigene erkennen und somit gezielt an die Krebszelle binden. Die Antikörper sind mit geeigneten Toxinen derart modifiziert, daß nach erfolgter Bindung an die Krebszelle das Toxin freigesetzt und die Krebszelle mortalisiert wird. Eine andere Alternative zur Verbesserung der therapeutischen Breite besteht darin, durch geringfügige Modifizierung der pharmakologisch aktiven Substanz, beispielsweise durch Herstellung von Säure- oder Basenadditionssalzen oder durch Herstellung von einfachen Estern [beispielsweise Fettsäureester; J. Pharm. Sci. 79, 531 (1990)], die physikalischen Eigenschaften der zugrundeliegenden aktiven Substanz derart zu verändern, daß die Löslichkeit oder Verträglichkeit der aktiven Substanz verbessert wird. Diese geringfügig chemisch modifizierten Verbindungen werden oft auch als sogenannte "Prodrugs" bezeichnet, da sie beim Kontakt mit Körperflüssigkeiten oder in der Leber (first pass-Metabolismus) nahezu unmittelbar in das eigentliche therapeutisch aktive Agens umgewandelt werden.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem bestand darin, ein neues Target aufzufinden, das möglichst spezifisch auf oder in Zellen vorkommt, die ein Zielobjekt für die Verabreichung von pharmakologisch aktiven Substanzen darstellen. Das Target sollte mit entsprechenden pharmazeutischen Wirkstoffen in Wechselwirkung treten, so daß die Wirkstoffe möglichst spezifisch zu diesen Zielzellen transportiert, von diesen erkannt, gebunden und aufgenommen werden können. Der pharmazeutische Wirkstoff sollte dabei im wesentlichen aus zwei Bestandteilen aufgebaut sein, wobei der erste Bestandteil für die Erkennung und Wechselwirkung mit dem Target verantwortlich ist (ligandspezifischer Teil) und der zweite Bestandteil die eigentliche aktive Substanz (wirkstoffspezifischer Teil) darstellt, der erst dann seine Wirkung entfaltet, wenn die spezifische Bindung an das Targetmolekül und die intrazelluläre Abspaltung des eigentlich

aktiven Agens oder dessen Monophosphates erfolgt ist. Dadurch soll die unerwünschte Freisetzung der pharmakologisch aktiven Substanz in den Körperflüssigkeiten vermieden werden, so daß gesunde Zellen nicht durch das pharmakologisch aktive Agens negativ beeinflußt und unerwünschte Nebenwirkungen weitgehend vermieden werden. Der für 5 diesen Zweck für die Herstellung der Arzneiform verwendete pharmazeutische Wirkstoff sollte hierbei einerseits als Ligand für das Target dienen und andererseits das eigentliche aktive pharmakologische Agens enthalten, wobei dieses insbesondere auch auf Basis von bereits bekannten pharmazeutischen Wirkstrukturen beruhen kann, deren therapeutische Breite auf diese Weise signifikant verbessert werden soll.

10

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß sich als Target LCE eignet, wobei LCE vorwiegend auf oder in malignen, aktivierten oder virusinfizierten Zellen, insbesondere auf humanen peripheren Blutleukozyten, Makrophagen, Nieren-, Nebennieren- oder Ovarialzellen, Zellen des lymphatischen Systems oder der lymphoiden Organe oder Zellen 15 des Gehirns lokalisiert ist. Dieser Enzymkomplex und seine Analoga werden im folgenden auch kurz als LCE bezeichnet. LCE zeigt überraschenderweise keine über alle Organe verteilte gleichmäßige statistische Verteilung, sondern ist vorwiegend in Membranen von bestimmten Zellen zu beobachten, die als Zielobjekt für die Verabreichung von pharmakologisch aktiven Substanzen in Frage kommen. In Herz-, Knochenmark- und 20 Leberzellen konnte eine vergleichsweise nur sehr geringe Enzymaktivität festgestellt werden. Die Homogenat- bzw. Membranfraktionen der zur Isolierung des LCE verwendeten Zellen, Organe oder Gewebe zeigen verschiedene spezifische Aktivitäten oder Affinitäten des LCE, wobei in aktivierten Zellen die spezifische Aktivität oder die Affinität stark erhöht sind im Vergleich zu nicht-aktivierten Zellen. Dies läßt sich für humane 25 periphere Blutleukozyten-, Lymphozyten und Granulozyten sowie für humane und nicht-humane bzw. murine mononukleäre Zellen, wie z. B. Monozyten/Makrophagen belegen.

LCE zeichnet sich überraschenderweise dadurch aus, daß es als Substrat lipidähnliche Verbindungen zwischen dem Lipidgrundgerüst und der Verbrückungsstruktur einer 30 kovalent an diese Brücke gebundenen, physiologisch aktiven Substanz spaltet. Derartige Substrate können durch die allgemeine Formel I

umschrieben werden, wobei L für einen Lipidrest, B eine Brücke und D für eine pharmakologisch aktive Substanz steht bzw. B-D ein Wirkstoffphosphonat darstellt. Überraschenderweise besitzen die pharmazeutischen Wirkstoffe der Formel I im Vergleich zu den pharmakologisch aktiven freien bzw. unmodifizierten Substanzen D oder -B-D eine größere therapeutische Breite. Sie verbessern darüberhinaus oft deren Verweilzeit im Körper, die Bioverfügbarkeit oder die oft als kritischer Faktor bekannte Membrangängigkeit (z.B. Blut-Hirn-Schranke, Zellmembranen, etc.) der pharmakologisch aktiven Substanzen. Substrate der Formel I dienen somit als Trägersystem (Carrier) für die pharmakologisch aktive Substanz. Die Konjugate der Formel I können hinsichtlich ihrer Funktion als intrazelluläres Drug-Storage-, Drug-Targeting- und Drug-Delivery-System bezeichnet werden. Sie bewirken, daß die pharmakologisch aktive Substanz oder deren Prodrugform nach oraler Applikation intrazellulär freigesetzt wird, wobei diese Freisetzung in vorteilhafter Weise nicht unspezifisch in allen Zellen, Organen oder Geweben des Körpers stattfindet, sondern gezielt in solchen Zellen, die das LCE in der Zellmembran oder auch teilweise intrazellulär enthalten. Besonders überraschend ist jedoch, daß die Spaltung nicht bereits schon während des Transportes des Substrates durch die Körperflüssigkeiten, wie z.B. Blut, Serum oder Lymphflüssigkeit oder durch die Leber, erfolgt, sondern erst an oder in den entsprechenden Zielzellen. Auf diese Weise wird das unerwünschte Ausscheiden des Spaltproduktes durch die Niere oder Spaltung des Substrates in der Leber vermieden, so daß der weitaus größte Teil des Wirkstoffes an die jeweiligen Zielzellen transportiert wird. Derartige Zellen sind, wie oben bereits erwähnt, insbesondere pathophysiologisch oder physiologisch aktivierte Zellen, die als Zielobjekt für die Verabreichung von pharmakologisch aktiven Substanzen in Frage kommen, wie beispielsweise Blutleukozyten, Lymphozyten, Makrophagen und andere Zellpopulationen des immunologisch lymphatischen Systems. Insbesondere handelt es sich hierbei um aktivierte Zellen (z.B. Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Monozyten etc.), die beim jeweiligen Krankheitsgeschehen eine pathologische, physiologische, pathophysiologische oder symptomatische Rolle spielen.

Bei LCE handelt es sich um einen bisher noch nicht beschriebenen Enzymkomplex. Er zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß er als Substrat die Verbindung (3'-Desoxy-3'-azidothymidin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecyl-mercapto-2-decyloxy)-propylester (nach-

folgend kurz als AZT-DMDOPE bezeichnet) zu 3'-Desoxy-3'-azidothymidin-monophosphat und (3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propanol (DMDOP) spaltet. Ein weiteres bevorzugtes Substrat von LCE ist die Verbindung (3'-Desoxy-3'-fluorthymidin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester (FLT-DMDOPE), das zu 3'-

5 Desoxy-3'-fluorthymidin-5'-monophosphat und DMDOP gespalten wird. Alternativ wird auch (5-Fluoruridin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester (5-FU-DMDOPE) zu (5-Fluoruridin)-5'-monophosphat (5-FU-MP) und DMDOP gespalten.

Die hergestellten LCE-haltigen Präparationen sind frei von Phospholipase C. Dies konnte 10 sowohl durch verschiedene Kationenabhängigkeit der LCE-Aktivität, wie durch Phospholipase C-spezifische Inhibitoren, die LCE nicht inhibieren, gezeigt werden.

Zur Bestimmung des Umsatzes von AZT-DMDOPE durch Zellhomogenate, Membran- bzw. Zytosolfraktionen, vorzugsweise von verschiedenen humanen Zelltypen, wurde ein Enzym- 15 Assay etabliert (Beispiel 6).

Das Testprinzip beruht auf einer Spaltung der Muttersubstanz durch das LCE in AZT-MP und den korrespondierenden Thioetherlipidteil. [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE und nichtradioaktiv markiertes AZT-DMDOPE wurden hierfür eingesetzt. Der Thioetherlipidmetabolit

20 DMDOP wurde aus den Ansätzen extrahiert (Beispiel 7) und die Menge an radioaktiv markierter Substanz im Flüssigkeits-Szintillations-Analysator gemessen. Da eine definierte Menge an [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE im Enzym-Assay eingesetzt wurde konnte der Umsatz der enzymatischen Spaltung bestimmt werden.

25 Das Enzym wird vorzugsweise aus humanen peripheren Blutleukozyten, die zuvor durch PHA oder andere Stimulanten (z.B. Cytokine, etc.) aktiviert wurden, oder aus murinen Nierenzellen isoliert. Aus vorläufigen Untersuchungen ergibt sich ein Molekulargewicht von etwa 120.000 - 160.000, bestimmt nach der SDS-PAGE-Methode. Zellen, die dieses Enzym enthalten, können auf einfache Weise dadurch identifiziert werden, indem sie unter geeigneten Testbedingungen mit einer Lösung von AZT-DMDOPE oder FLT-DMDOPE 30 versetzt werden und die Spaltprodukte AZT-monophosphat bzw. FLT-monophosphat oder DMDOP nachgewiesen werden, beispielsweise durch dünnenschichtchromatographische Methoden oder im Fall von radioaktiv markierten Proben durch szintillatographische

Verfahren (siehe Beispiele 4 - 7). Im Gegensatz zu den biochemisch verwandten Phospholipasen C oder -D wird das LCE nicht durch bekannte Inhibitoren von Phospholipase C oder -D gehemmt oder durch Aktivatoren von Phospholipase C oder -D aktiviert. Im Gegensatz zu Phospholipase C wird das Enzym durch die Substanz D 609 (Tricyclodecan-5-yl-xanthogenat;  $C_{11}H_{15}OS_2$  K) aktiviert, während D 609 Phospholipase C inhibiert.

Intrazelluläres AZT zeigt in seiner nichtphosphorylierten Form keine inhibitorische Wirkung auf die virale reverse Transkriptase (RT) (Nakashima et al., 1986, *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 933-937; Mitsuya et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7096-7100).

10 Durch die intrazellulären Enzyme Thymidin-Kinase, Thymidilat-Kinase und Pyrimidin-Nukleosid-Diphosphat-Kinase (Yarchoan et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321, 726-738; Toyoshima et al., 1991, *Anal. Biochem.* 196, 302-307) wird das Strukturanalogen von Thymidin durch sukzessive Phosphorylierung über AZT-MP und AZT-DP in das therapeutisch wirksame, RT inhibierende AZT-TP überführt. AZT-DMDOP, als 15 Thioetherlipid-AZT-Konjugat, könnte durch intrazelluläre enzymatische Spaltung in AZT oder direkt in die bereits phosphorylierte Form AZT-MP überführt werden. In Beispiel 8 werden die intrazellulären Konzentrationen an phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem AZT nach Inkubation mit äquipotenten Konzentrationen an AZT-DMDOP und AZT bestimmt.

20 Der Enzymkomplex und seine Analoga zeigen ferner in verschiedenen Spezies (z. B. Mensch, Maus, Ratte, Hund, Affe) keine gleichmäßige statistische Organverteilung, sondern sind nur in den Membranen von bestimmten Zellen, Organen oder Geweben vorzufinden, die als Targetzellen für spaltbare Konjugate der Formel I dienen. Die 25 natürlichen Substrate dieser Enzyme sind bislang noch unbekannt. In zytosolischen Fraktionen liegt die LCE-Aktivität immer unter oder gerade an der Nachweisgrenze. Sehr geringe Aktivität ist z.B. auch in Knochenmarkzellen festzustellen, was auf eine sehr geringe oder sogar gänzlich fehlende Knochenmarktoxizität der als Substrate des LCEs eingesetzten pharmazeutischen Wirkstoffe der Formel I schließen lässt.

30 Die LCE-Aktivität zeigt eine lineare Protein- und Zeitabhängigkeit, eine spezifische Abhängigkeit von Metallkationen (Inhibierung durch  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ ) und eine klassische Michaelis-Menten-Kinetik (Substratabhängigkeit) (Beispiel 9). Neben der

höheren Aktivität des Enzymkomplexes in aktivierten Zellen zeigt sich unter diesen Bedingungen auch eine höhere Affinität des LCE zum Substrat.

Das isolierte oder aus Membranfraktionen stark angereicherte LCE lässt sich auch zum 5 Screening auf neue, potentiell spaltbare Substrate oder auch natürlicherweise vorkommende Substrate einsetzen. Die so gefundenen Substrate können dann weitergehend untersucht werden hinsichtlich ihrer essentiellen Strukturmerkmale, die für die Erkennung des Substrates und die Bindung an LCE erforderlich sind. Derartige identifizierte Struktureigenschaften können dann verwendet werden, um chemisch modifizierte Substrate herzustellen, die diese essentiellen Merkmale enthalten, sowie darüber hinaus geeignete funktionelle Gruppen, die sich zur Kopplung mit pharmakologisch aktiven 10 Substanzen eignen.

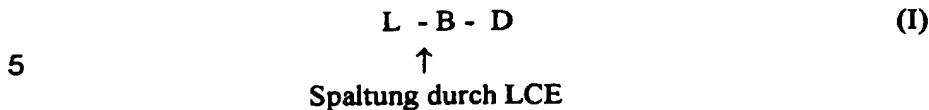
Auch ein Screening auf Inhibitoren oder Aktivatoren des Lipid-Cleavage-Enzym ist somit 15 möglich.

Diagnostisch kann das isolierte oder stark angereicherte Enzym eingesetzt werden, wenn beispielsweise gesteigerte oder reduzierte Lipid-Cleavage-Enzym-Aktivitäten zu pathologischen Veränderungen in vitro oder in vivo führen, oder mit diesen pathologischen Ver- 20 änderungen entsprechende Erkrankungen oder Krankheitssymptome einhergehen.

Ebenso kann das LCE zur Herstellung von diagnostischen Mitteln eingesetzt werden, die dazu verwendet werden, um bei der Verabreichung der pharmazeutischen Wirkstoffe an Patienten die Spaltung dieser Substrate zu prüfen, was zur spezifischen und individuellen 25 Anpassung der Therapiemodalitäten bei diesen Patienten führt (Drugmonitoring).

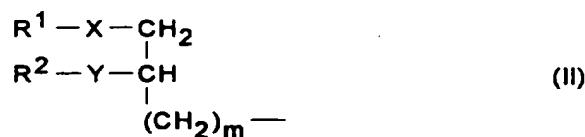
Rekombinantes LCE kann nach wohletablierten Verfahren hergestellt werden, indem von LCE oder LCE-Fragmenten die Aminosäuresequenz bestimmt wird und mit entsprechend konstruierten Oligonukleotid "probes" eine menschliche oder andere Säugetier-Genbank abgesucht wird. Das gefundene Gen wird dann durch einen entsprechenden Vektor in 30 einem prokaryotischen und eukaryotischen Zellsystem exprimiert. Das rekombinante LCE kann dann nach in Proteinchemie bekannten Verfahren aufgereinigt werden (siehe z. B. Maniatis, Molecular Cloning).

Das LCE zeichnet sich insbesonders dadurch aus, daß es Verbindungen des allgemeinen Typs I



spalten kann, in dem L einen Lipidteil darstellt, B eine Brücke kennzeichnet und D für eine pharmakologische aktive Substanz steht bzw. B-D ein Wirkstoffphosphonat bedeutet. Die 10 sehr spezifische Spaltung erfolgt zwischen Lipidteil und Phosphatrest. Eine unspezifische Spaltung der Verbindungen der Formel I an anderen funktionellen Gruppen im Molekül wird nicht beobachtet.

Bevorzugt stellt der Lipidteil L des Konjugats der Formel I dabei folgenden Rest der 15 Formel II dar,



in dem

20  $\text{R}^1$  eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylkette mit 1-30 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch Halogen, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-Cycloalkyl, Phenyl, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercapto-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy carbonyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylsulfinyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylsulfonylgruppen substituiert sein kann,

25  $\text{R}^2$  Wasserstoff, eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylkette mit 1-20 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch Halogen, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-Cycloalkyl, Phenyl, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercapto-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy carbonyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylsulfonylgruppen substituiert sein kann,

X einen Valenzstrich, Sauerstoff, Schwefel, Aminocarbonyl, Oxycarbonyl, Carboxyamino, Carboxyloxy, Carbonyllamido, Amidocarbonyl, die Sulfinyl- oder die Sulfonylgruppe darstellt,

5 Y ein Valenzstrich, Aminocarbonyl, Oxycarbonyl, Carboxyamino, Carboxyloxy, Carbonyllamido, Amidocarbonyl, ein Sauerstoff- oder Schwefelatom ist, und

m eine ganze Zahl zwischen 1 und 5 darstellt.

10 In der allgemeinen Formel II bedeutet R<sup>1</sup> vorzugsweise eine geradkettige oder verzweigte C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-Alkylgruppe, die noch durch eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy- oder eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercaptopropgruppe substituiert sein kann. R<sup>1</sup> stellt insbesondere eine Nonyl-, Decyl-, Undecyl-, Dodecyl-, Tridecyl- oder Tetradecylgruppe dar. Als C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy-substituenten von R<sup>1</sup> kommen vorzugsweise die Methoxy-, Ethoxy-, Butoxy- und die Hexyloxygruppen in Frage. Ist R<sup>1</sup> durch einen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercaptoprest substituiert, versteht man darunter insbesondere den Methylmercapto-, Ethylmercapto-, Propylmercapto-, Butylmercapto- und den Hexylmercaptorest.

15 R<sup>2</sup> bedeutet vorzugsweise eine geradkettige oder verzweigte C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-Alkylgruppe, die noch durch eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxygruppe oder eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercaptopropgruppe substituiert sein kann. R<sup>2</sup> stellt insbesondere eine Octyl-, Nonyl-, Decyl-, Undecyl-, Dodecyl-, Tridecyl- oder Tetradecylgruppe dar. Als C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy-substituenten von R<sup>2</sup> kommen vorzugsweise die Methoxy-, Ethoxy-, Propoxy-, Butoxy- und die Hexyloxygruppe in Frage. Ist R<sup>2</sup> durch einen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercaptoprest substituiert, versteht man darunter insbesondere den Methylmercapto-, Ethylmercapto-, Butylmercapto- und Hexylmercaptorest.

20 X ist bevorzugt gleich Schwefel, Sulfinyl oder Sulfonyl und Y gleich Sauerstoff. Die Heteroatome X und Y im Lipidteil L können nur in Ausnahmefällen durch die aus Lecithin bekannten Carbonsäureester ersetzt werden, da sonst häufig schon im Serum oder in der Leber (first pass-effect) eine hydrolytische Spaltung zu den entsprechenden Lysolecithin-Derivaten oder Glycerolestern mit entsprechend schnellerer Elimination der pharmakologisch aktiven Substanz erfolgen würde. Die Thioether- bzw. Etherlipide (X, Y = O, S)

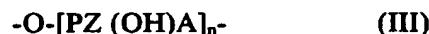
25

dieser Anmeldung zeigen diese Spaltung im Serum verschiedener Spezies, inklusive des Menschen, nicht.

Bevorzugt sind auch Verbindungen, in denen X und Y einen Valenzstrich darstellen, R<sup>2</sup> 5 gleich Wasserstoff ist und R<sup>1</sup> eine C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>-Alkylkette darstellt, die gegebenenfalls durch C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy, oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercapto substituiert sein kann.

m ist bevorzugt gleich 1 oder 2 und besonders bevorzugt gleich 1.

10 Die Brücke B umschreibt einen Valenzstrich, oder wird durch die Formel III umschrieben,



in der n = 1, 2 oder 3 sein kann, aber bevorzugt gleich 1 oder 2 ist und insbesondere 1, Z 15 gleich O oder S, und A entweder O, S oder ein Valenzstrich, bevorzugt O ist.

Der Lipidteil L und die Phosphatbrücke B haben die oben angegebene Bedeutung, wobei L bevorzugt einen Rest der Formel II darstellt und B bevorzugt eine Phosphatbrücke der Formel III ist. Besonders bevorzugt ist eine Phosphatbrücke der Formel III mit n = 1 und 20 ein Lipidteil der Formel II, in dem R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> einen Alkylrest mit 8-15 C-Atomen darstellen, X gleich Schwefel und Y gleich Sauerstoff ist. Weiterhin sind Verbindungen bevorzugt, in denen B als Phosphonat ein Bestandteil der Wirkstoffstruktur ist, wobei n = 1 und A ein Valenzstrich ist.

25 Der Begriff "pharmakologisch aktive Substanz" (Bezeichnung D bzw. B-D bei Phosphonaten in Formel I) steht in dieser Anmeldung für einen Wirkstoff im arzneimittelrechtlichen Sinne. Dieser Wirkstoff kann ein Wirkstoff eines bereits eingeführten, von Arzneimittelbehörden zugelassenen Pharmazeutikums oder ein sich in der arzneimittelrechtlichen Zulassung befindlicher Wirkstoff sein. Die Definition 30 "pharmakologisch aktive Substanz" umfaßt auch solche Derivate von Wirkstoffen, die durch Einführung einer oder mehrerer funktioneller Gruppen (beispielsweise solche Gruppen, die eine Kupplung von D mit dem Lipid-Carrier-Teil L ermöglichen, wie z.B. Hydroxy- oder Aminogruppen) chemisch modifiziert werden können. Die Definition

umfaßt ferner die aus dem Wirkstoff D sich bildenden Prodrugformen, die ebenfalls physiologisch aktiv sind. Insbesondere kommen solche pharmakologisch aktive Substanzen D in Frage, deren klinische Entwicklung aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen eingestellt oder nicht begonnen wurde, bzw. die über ein sehr enges Dosis-  
5 Wirkungs-Spektrum verfügen, so daß die Verabreichung der therapeutisch erforderlichen Menge nur mit hohen Risiken oder praktisch überhaupt nicht beherrschbar war.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die therapeutische Breite einer pharmakologisch aktiven Substanz D bzw. B-D im Falle von Wirkstoffphosphonaten signifikant  
10 verbessert wird, wenn die Substanz an ein lipidartiges Trägermolekül gekoppelt wird. Das so hergestellte Konjugat dient als neuer Wirkstoff für die Herstellung von pharmazeutischen Darreichungsformen. Insgesamt resultiert aus der Kopplung eine verstärkte Wirkung der pharmazeutisch aktiven Substanz D bzw. B-D in vivo, da durch das entstehende Drug-Delivery-Transport-System eine Lokalisierung der pharmakologisch  
15 aktiven Substanz in Zielzellen erfolgt und dadurch die pharmakologisch aktive Substanz hinsichtlich ihrer Effizienz gesteigert wird. Dies bedeutet, daß einerseits die Menge der zu verabreichenden pharmakologisch aktiven Substanz reduziert werden kann, oder andererseits unter Beibehaltung der gleichen effektiven Menge eine verstärkte pharmakologische Wirkung erzielt wird.

20 Die den pharmakologisch aktiven Substanzen D bzw. B-D zugrundeliegende chemische Struktur kann ferner derart modifiziert werden, daß die Substanzen hinsichtlich ihrer physikalischen oder chemischen Eigenschaften verändert sind und beispielsweise eine höhere oder geringere Lipophilie aufweisen, jedoch hinsichtlich ihrer therapeutischen  
25 Wirkung im wesentlichen die gleichen Eigenschaften besitzen wie die unmodifizierte Substanz D bzw. B-D. Insbesondere ist es vorteilhaft, wenn die Substanz D durch Einführung von funktionellen Gruppen chemisch derart modifiziert wird, daß sie über eine geeignete Brücke an den Lipidteil L gekoppelt werden kann. Dies geschieht beispielsweise durch Einführung von Hydroxygruppen, die über die Phosphatgruppe B an das Lipid  
30 gekoppelt werden.

Die pharmakologisch aktive Substanz D bzw. B-D stellt eine chemische oder auf biologischer Basis (Antikörper, Peptid, Protein, Hormon, Toxin etc.; INDEX

NOMINUM, International Drug Directory, Medpharm) aufgebaute Substanz mit biologischer Wirkung dar, sowie deren durch Einführung einer funktionellen Gruppe (z.B. einer Hydroxygruppe) chemisch modifizierten Derivate. Eine Voraussetzung ist, daß die pharmakologisch aktive Substanz oder ihre Prodrugform über die Spaltung des 5 Liponukleotids durch das Lipid-Cleavage-Enzym eine "Aktivierung" durch dieses körpereigene Enzym erfahren. Bevorzugt sind dabei pharmakologisch aktive Substanzen, die nach Spaltung durch das LCE als pharmakologisch aktives Substanzmonophosphat in vivo als Zwischenprodukt fungieren und durch zelluläre Enzyme weiter aufphosphoryliert werden, wie z.B. Nukleosid-Monophosphat zum Nukleosid-Triphosphat, oder zur freien 10 pharmakologisch aktiven Substanz gespalten werden (siehe Beispiel 8).

Im Sinne der Erfindung kommen insbesondere alle *in vitro* wirksamen, jedoch *in vivo* im therapeutischen Bereich toxischen pharmakologisch aktive Substanzen in Frage, d.h. alle Substanzen mit kleiner therapeutischer Breite, die über eine chemisch funktionelle Gruppe 15 zur Knüpfung der kovalenten Bindung zum Phosphat verfügen. Außerdem können auch solche Substanzen verwendet werden, die in ihrer pharmakologisch aktiven Form zunächst keine funktionelle Gruppe enthalten, diese sich jedoch durch chemische Modifikation einführen läßt, ohne daß ein Verlust der Wirkung der Substanz eintritt.

20 Bevorzugt werden solche pharmakologisch aktive Substanzen zur Konjugation mit einem Lipidrest L verwendet, die normalerweise nach Phosphorylierung ihre aktive Form erreichen (wie z.B. im Fall von Nukleosiden) bzw. Wirkstoffphosphonate. Aus dem Konjugat wird dann das pharmakologisch aktive Substanzphosphat durch enzymatische Hydrolyse des Konjugats freigesetzt. Die Freisetzung der phosphorylierten Substanz ist insbesondere 25 deshalb von Bedeutung, da dieser Prozeß auch in solchen Zellen stattfinden kann, die nicht über die normalerweise zur Aufphosphorylierung der reinen pharmakologisch aktiven Substanz nötigen Enzyme (Kinasen) verfügen. Die konjugierte und via LCE intrazellulär oder in der Zellmembran freigesetzte pharmakologisch aktive Substanz kann beispielsweise eine zytostatische, zytotoxische, antitumorale, antivirale, antiretrovirale, 30 immunsupprimierende oder immunstimulierende Wirkung aufweisen.

Als pharmakologisch aktive Substanzen D kommen solche Verbindungen in Frage, die gegebenenfalls durch Einführung einer funktionellen Gruppe, die die Wirkung nicht

signifikant beeinflußt, in ein kopplungsfähiges Derivat überführt werden, das dann z.B. das Tumorwachstum verlangsamt, eine in die DNA und/oder RNA interkalierende Substanz ist, die Topoisomerase I und II hemmt, ein Tubulinhemmer ist, ein Alkylanz ist, eine die Ribosomen inaktivierende Verbindung ist, ein Tyrosinphosphokinase-Inhibitor ist, ein Differenzierungsinduktor ist, ein Hormon, Hormonagonist oder Hormonantagonist ist, eine Substanz ist, welche die pleiotrope Resistenz gegenüber Zytostatika verändert, ein Calmodulin-Inhibitor ist, ein Proteinkinase C-Inhibitor ist, ein P-Glycoprotein-Inhibitor ist, ein Modulator der mitochondrial gebundenen Hexokinase ist, ein Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase oder der Glutathion-S-Transferase ist, ein Inhibitor der Superoxid-10 dismutase ist, ein Inhibitor der Reversen Transkriptase von HIV-1 und -2 ist oder Inhibitoren für die Hepatitisviren A-E sind.

Die pharmakologisch aktive Substanz D bzw. B-D kann eine antiinflammatorische, antirheumatische, antiphlogistische, analgetische oder antipyretische Wirkung aufweisen. 15 Sie kann ferner ein Antiarrhythmikum, Calciumantagonist, Antihistaminikum, ein Hemmer der Phosphodiesterase oder ein Sympathomimetikum bzw. Parasympathomimetikum sein.

Als pharmakologisch aktive Substanzen D bzw. B-D kommen alle Substanzen in Frage mit kurzer Halbwertszeit, insbesondere auch Verbindungen mit unterschiedlicher Organ-, 20 Gewebe-, oder Zellhalbwertszeiten; mit schlechter Bioverfügbarkeit, d.h. mit schlechter Resorption, hoher Leberspaltung oder schneller Elimination; mit schlechter Membranpenetration (z.B. Zellmembran, Blut-Hirnschranke); mit Knochenmarktoxizität oder anderen limitierenden Organtoxizitäten (z.B. Cardio-, Leber-, Nephro-, Neurotoxizität etc.), deren Wirkkonzentration in vivo zu gering ist. Außerdem sind solche 25 Substanzen geeignet, die gezielt mit dem Zellkern der Zielzellen in Wechselwirkung treten und auf der Ebene der DNA oder RNA in das molekulare Geschehen eingreifen, wie z.B. Antisense-Oligonukleotide, DNA-Fragmente, und die für die Gentherapie verwendet werden können.

30 Pharmakologisch aktive Substanzen D in der Formel I sind beispielsweise: AZT (Azidothymidin), FLT (Fluorothymidin), 5-Fluorouracil, 5-Fluoruridin, 6-MPR, Fludarabin, Cladribin, Pentostatin, ara-C, ara-A, ara-G, ara-H, Acyclovir, Ganciclovir, Doxorubicin, 4'-epi-Doxorubicin, 4'-Desoxy-doxorubicin, Etoposid, Daunomycin,

Idarubicin, Epirubicin, Mitoxantron, Vincristin, Vinblastin, Taxol, Colchicin, Melphalan, 3'-Desoxy-2-fluoradenosin, FdA, 5-Ethynyluracil-9- $\beta$ -D-arabinofuranosid, 5-Propinyluracil-9- $\beta$ -D-arabinofuranosid, d4T, ddU, ddI, ddA, d2T, 2'-Desoxy-2',2'-difluorcytidin, 5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin, 5-Chlor-2',3'-didesoxy-3'-fluoruridin, 3'-5 Desoxy-3'-fluor-myoinositol, Neplanocin A, Ribavirin, Myoinositol, Fialuridin, 3TC (Lamivudin), Doxifluridin, Tegafur, Hypericin, Pseudohypericin, Usevir, Famciclovir, Penciclovir, Foscarnet, Carvedilol, Actinomycin A, Bleomycin, Daunorubicin, Floxuridin, Mithramycin, Mitomycin C, Mitoxanthron, Streptozotocin, Vindesin, Netilmycin, Amikacin, Gentamycin, Streptomycin, Kanamycin A, Tobramycin, Neomycin B, 10 Plicamycin, Papamycin, Amphotericin B, Vancomycin, Idoxuridin, Trifluridin, Vidarabin sowie Morphine, Prostaglandine, Leukotriene oder Cyclosporine. Ferner kommen in Frage: Terfenadin, Dexamethason; Terbutalin; Prednisolon; Fenoterol; Orciprenalin; Salbutamol; Isoprenalin; Muscarin; Bupranolol; Oxyphenbutazon; Östrogen; Salicylsäure; Propranolol; Ascorbinsäure; Spongiadiol; Diclofenac; Isospongiadiol; Flufenaminsäure; 15 Digoxin; 4-Methyl-aminophenazon; Allopurinol; Theophyllin; Epoprostenol; Nifedipin; Chinin; Reserpin; Methotrexat; Chlorambucil; Spergualin; Ibuprofen; Indomethacin; Sulfasalazin; Penicillanamin; Chloroquin, Azathioprin.

Pharmakologisch aktive Substanzen B-D in der Formel I sind beispielsweise PMEA und 20 andere acyclische Nucleosid-Phosphonat-Analoga, Chinolin-phosphonsäuren, MP-101, Fostedil, HAB-439, 2-Amino-7-phosphonoheptansäure, Fosfosal, Fosphenytoin, Atrinositol, Cyplatate, Difficidin, Fosquidone, Alafosfalin, Foteumstine, Etoposide, Encyt/E, 4-Oxo-S-phosphono-D-norvalin und andere NMDA-Antagonist-Phosphonate.

25 Bevorzugte pharmakologisch aktive Substanzen sind auch beispielsweise Peptide, Proteine und Oligonucleotide, wie z.B. Corticotropin, Calcitonin, Desmopressin, Gonadotropin, Goserelin, Insulin, Zypressin, beta-Melanotropin, alpha-Melanotropin, Muramylpeptid, Oxytocin, Vaopressin, FK-506, Octreotid oder Enalkiren.

30 Die oben erwähnten pharmakologisch aktiven Substanzen und die daraus herzustellenden Konjugate stellen nur Beispiele dar und schränken den erfindungsgemäßen Gedanken nicht ein.

Verbindungen der Formel I und deren Herstellung sind in den Anmeldungen WO 92/03462, WO 93/16092, WO 93/16091, WO 94/03465, PCT/EP94/02123, DE 4402492, DE 4418690, sowie beispielsweise in WO 91/19726; EP 0 350 287; US 5,223,263; US 5,194,654; US 4,921,951; US 4,622,392; US 4,291,024; US 4,283,394 beschrieben. Im

5 Falle von antiviral wirksamen Nucleosiden werden in EP 0 350 287 und US 5,223,263 Lipid-Derivate (Diacylglycerol-Nucleoside) und deren Verwendung in liposomaler Form beschrieben. Bevorzugt in Form von Liposomen soll eine Aufnahme der Substanz durch Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES), z. B. Makrophagen und Monozyten möglich sein.

10 Durch entsprechende Vergleichsversuche konnte gezeigt werden, daß die therapeutischen Effekte der aus EP 0 595 133 bekannten Diacylglycerol-Konjugate in vivo den Thioether- oder Etherlipid-Konjugaten aus WO92/03462 unterlegen sind. Dies ist auf eine unspezifische, nicht nur am Wirkort stattfindende Hydrolyse der Fettsäureester zurückzuführen.

15 Die nicht-hydrolysierbaren Thioether- und Etherreste zeigen demgegenüber entscheidende Vorteile, da erst durch das spezielle Enzym (LCE) in den Membranen des Zielgewebes bzw. intrazellulär eine Substanz mit biologischer Wirkung oder entsprechende Zwischenprodukte freigesetzt werden.

20 Die Konjugate der Formel I (L-B-D) zeigen entscheidende Vorteile im Vergleich zur nicht konjugierten pharmakologisch aktiven Substanz D bzw. B-D: Der spezifische, kovalent an die pharmakologisch aktive Substanz gebundene Carrier (L-B- bzw. L) verbessert die Bioverfügbarkeit von schlecht resorbierten pharmakologisch aktiven Substanzen, die Verträglichkeit von potentiell toxischen Wirkmolekülen, die Verweilzeit von schnell

25 eliminierten oder metabolisierten Arzneimitteln und die Membranpenetration von schlecht membrangängigen Verbindungen (z.B. Blut-Hirn, Zellen etc.). Die enzymatische Spaltung in vivo in Carrier und pharmakologisch aktive Substanz D (bzw. Substanz-Derivat) bzw. in Carrier und pharmakologisch aktives Substanzphosphat (D-Monophosphat) oder Phosphonat B-D erfolgt in der Regel nicht im Serum sondern erst intrazellulär. Außerdem verbessert der Carrierteil mit seiner lecithinartigen Struktur, die für den beanspruchten Effekt essentiell ist, die Penetration oder Membrangängigkeit der pharmakologisch aktiven Substanz und zeigt in vielen Fällen einen Depoteffekt. Darüberhinaus ist die gastrointestinale Verträglichkeit der Lipidkonjugate L-B-D vielfach besser als die der

30

reinen pharmakologisch aktiven Substanzen D. Auch bei der Resorption zeigt das Lipid-Konjugat eine bessere Penetration durch Membranstrukturen und somit eine bessere Überwindung der Resorptionsbarrieren. Entsprechendes gilt für die Penetration z.B. der Blut-Hirn-Schranke durch erleichterte Diffusion oder eventuell aktiven Transport.

5 Besonders bevorzugt sind Konjugate der Formel I mit der Einschränkung des Lipidteils durch die Formel II, die durch enzymatische Hydrolyse mit dem Lipid-Cleavage-Enzym eine Substanz mit biologischer Wirkung abspalten, die in vivo zu weniger Nebenwirkungen führt als nach Verabreichung der pharmakologisch aktiven Substanz allein.

10

Durch eine bessere Bindung des Konjugats an Plasma- und Gewebeproteine wird ferner die Verteilung in vivo verbessert. Durch normale Biotransformation wird das Konjugat primär vom Thioether (X=S) zum Sulfoxid (X=SO) oxidiert, was aber aufgrund der equipotenten Wirkung des Sulfoxids im Vergleich zum Thioether keinen Nachteil darstellt.

15

Durch eine langsame Freisetzung der pharmakologisch aktiven Substanz aus dem Konjugat wird ein niedriger, aber über einen längeren Zeitraum konstanter aktiver Substanzspiegel gewährleistet und somit die Wirkung verbessert oder toxische Nebeneffekte vermieden. Die freigesetzte pharmakologisch aktive Substanz in Form des Monophosphats penetriert wegen seiner großen Hydrophilie nicht mehr aus der Zelle

20 heraus.

Sowohl die Gesamtkörper-, Zell- als auch die Organ-Halbwertszeiten der pharmakologisch aktiven Substanz werden durch Konjugation aufgrund der längeren Verweilzeit des Konjugats im Organismus erheblich verlängert. Aufgrund der fehlenden

25

LCE-Aktivität zur Spaltung im Serum und in einigen Organen ist nahezu keine bzw. nur eine sehr geringere Knochenmark- und Organtoxizität zu beobachten. Insbesondere ist vorteilhaft, daß die Konjugate der Formel I in verschiedenen Zielorganen, Geweben oder Zellen spezifisch angereichert werden.

30

Die Verbindungen der Formel I können als Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln verwendet werden, die für alle Erkrankungen eingesetzt werden, bei denen hohe pharmakologisch aktive Substanzspiegel in Zellen, Organen oder Geweben erforderlich oder hilfreich sind. Eine wesentliche Voraussetzung für dieses als "Drug-Storage-Delivery-

Targeting" zu bezeichnende Transportsystem ist, daß die im Sinne der beabsichtigten Therapie anzusprechenden Zellen das Lipid-Cleavage-Enzym in den inneren oder äußeren Zellmembranen aufweisen, so daß in einem ersten Schritt der Wirkstoff an das LCE bindet und anschließend über die Zellmembran hinweg in das Innere der Zelle transportiert wird,

5 wobei die Spaltung des Wirkstoffes zu der physiologisch aktiven Substanz entweder im wesentlichen gleichzeitig mit dem Transport über die Zellmembran oder auch später teilweise innerhalb der Zelle erfolgt. Die intrazelluläre Spaltung kommt insbesondere in solchen Fällen vor, bei denen das LCE auch innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Im Sinne der 10 Erfahrung kann die Spaltung des Wirkstoffes verbunden mit der intrazellulärer Freisetzung der pharmakologisch aktiven Substanz auch derart erfolgen, daß entweder die physiologisch oder pharmakologisch aktive Substanz dabei direkt entsteht oder eine dieser Substanz entsprechende Vorstufe (Prodrugform). Geeignete Zielzellen sind beispielsweise Blutleukozyten (PBLs), Monozyten, Nierenzellen oder Makrophagen und Zellen des immunologisch lymphatischen Systems.

15

Insbesondere wirken die Verbindungen der Formel I immunmodulierend, para-/sympatholytisch, -mimetisch, zentral und/oder peripher muskelrelaxierend; antihyperton, 20 antihypoton, antioabstruktiv, analgetisch, antiphlogistisch, antiemetisch, antiinflammatorisch, antiallergisch, antiasthmatisch, antipyretisch, antiulzerativ, antacid, antianginös, antiarrhythmisch, antipsychotisch, antidepressiv, antiepileptisch, antikonvulsiv, antiparkinsonoid, 25 antihistaminerg, antimuscarinerg, antiserotoninerg, antigabaerg, antiadrenerg, anticholinerg, glykosidisch, chronotrop, bathmotrop, dromotrop, inotrop, diuretisch, anti-diuretisch, urikosurisch, urikostatisch, anti-hypolipidämisch, antifibrinogen, antidiabetisch, blutzuckersenkend, antiöstrogen, antiandrogen, antigestagen, antiosteoporotisch, thyreostatisch, Knochenwachstum-stimulierend, narkotisch, anästhetisch, antihypnotisch, 30 antiinfektiös, antibiotisch, antituberkulostatisch oder hämatopoetisch oder stellen ein Vitamin dar.

Steigern läßt sich die überlegene Wirkung einer der erfindungsgemäßen Verbindungen durch Kombination mit geeigneten Arzneimitteln oder Kombination von zwei verschiedenen Konjugaten der vorliegenden Anmeldung.

Beispielsweise lässt sich die Wirkung eines zytostatischen oder zytotoxischen Konjugats dieser Anmeldung durch Kombination mit anderen zytostatischen oder zytotoxischen Verbindungen steigern, bevorzugt dann, wenn Komponenten mit unterschiedlichem Wirkmechanismus verwendet werden oder Kombination eines zytostatischen oder zytotoxischen Konjugats mit einem antiviralen Konjugat (Synergismus, z.B. bei AIDS).

10 Besonders geeignet sind erfindungsgemäße Konjugat-Kombinationen, bei denen eine Komponente zytostatisches oder zytotoxisches Potential hat und die andere Komponente z.B. die Multi-Drug-Resistenz durchbricht oder eine Komponente die Reverse Transkriptase von HIV und die andere Komponente z.B. die Protease inhibiert oder die beiden Liponucleotide der Kombination keine Kreuzresistenz zeigen. Die Verbindungen der Formel I und ihre pharmazeutische Zubereitungen können auch zur Herstellung von Arzneimitteln verwendet werden, die sich in Kombination mit anderen Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von verschiedenen Erkrankungen eignen.

15 15 Als mögliche Salze der Verbindungen der allgemeinen Formel I kommen vor allem Alkali-, Erdalkali- und Ammoniumsalze der Phosphatgruppe in Frage. Als Alkalosalze sind Lithium-, Natrium- und Kaliumsalze bevorzugt. Als Erdalkalosalze kommen insbesondere Magnesium- und Calciumsalze in Frage. Unter Ammoniumsalzen werden erfindungsgemäß 20 Salze verstanden, die das Ammoniumion enthalten, das bis zu vierfach durch Alkylreste mit 1-4 Kohlenstoffatomen und/oder Aralkylreste, bevorzugt Benzylreste, substituiert sein kann. Die Substituenten können hierbei gleich oder verschieden sein.

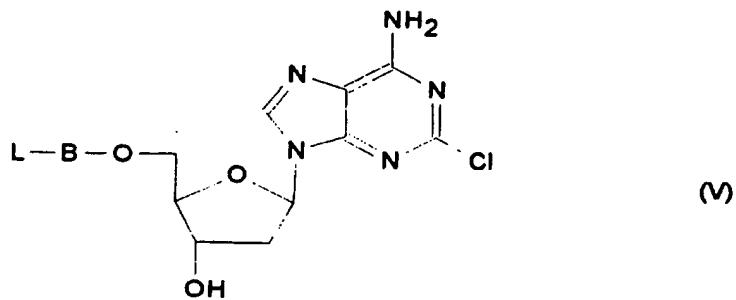
25 25 Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können basische Gruppen, insbesondere Amino-Gruppen enthalten, die mit geeigneten anorganischen oder organischen Säuren in Säureadditionssalze überführt werden können. Als Säuren kommen hierfür beispielsweise in Betracht: Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Fumarsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Maleinsäure oder Methansulfonsäure.

30 30 Neben den Verbindungen der allgemeinen Formel I sowie der Spezifizierungen gemäß Formel II und III beansprucht diese Anmeldung auch deren Tautomere und deren physio-

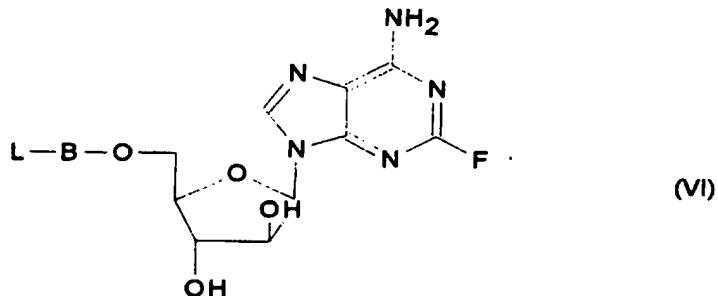
logisch verträgliche Salze anorganischer und organischer Säuren bzw. Basen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Verbindungen enthaltende Arzneimittel.

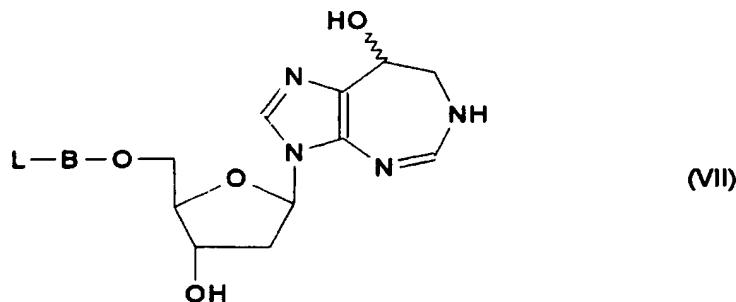
Da die Verbindungen der allgemeinen Formel I asymmetrische Kohlenstoffatome enthalten, sind auch sämtliche optisch aktiven Formen und racemische Gemische dieser Verbindungen Gegenstand der vorliegenden Erfundung.

Gegenstand dieser Anmeldung sind auch neue Liponucleotide. Die Darstellung dieser Konjugate wird exemplarisch in Beispielen 14-16 gezeigt. Das LCE spaltet auch 2-Chlor-2'-desoxy-adenosin-Konjugate (Cladribin-Konjugate) der Formel V, 9-( $\beta$ -D-Arabinofuranosyl)-2-fluoradenin-Konjugate (Fludarabin-Konjugate) der Formel VI, 3-(2-Desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-3, 6, 7, 8-tetrahydroimidazo [4, 5-d] [1, 3] diazepin-8-ol-Konjugate (Pentostatin-Konjugate) der Formel VII. Die genannten Verbindungen lassen sich therapeutisch besser anwenden als die entsprechenden Nucleoside allein, da sie eine sehr gute Wirksamkeit und eine große therapeutische Breite zeigen und die gleichen Vorteile haben, wie die oben genannten Derivate der Formel I:



20





Im Sinne der vorliegenden Erfindung werden als Verbindungen der Formel I insbesondere

5 folgende Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln verwendet:

1. (3'-Desoxy-3'-azidothymidin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecyl-mercaptopro-2-decyloxy)-propylester
- 10 2. (3'-Desoxy-3'-azidothymidin)-5'-phosphorsäure-(3-undecyl-mercaptopro-2-undecyloxy)-propylester
3. (3'-Desoxy-3'-fluorothymidin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecyl-mercaptopro-2-decyloxy)-propylester
- 15 4. (3'-Desoxy-3'-fluorothymidin)-5'-phosphorsäure-(3-undecyl-mercaptopro-2-undecyloxy)-propylester
5. (2',3'-Didesoxycytidin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecyl-mercaptopro-2-decyloxy)-propylester
- 20 6. (2',3'-Didesoxyinosin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecyl-mercaptopro-2-decyloxy)-propylester
7. (3'-Desoxythymidin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecyl- mercapto-2-decyloxy)propylester
- 25 8. (5-Fluoruridin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecyl-mercaptopro-2-decyloxy)propylester

9. (6-Mercaptopurin-9- $\beta$ -D-ribofuranosid)-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)propylester
10. (5-Trifluormethyluridin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecyl-mercapto-2-decyloxy)-  
5 propylester
11. (1- $\beta$ -D-Arabinofuranosyl-5-ethinyluracil)-5'-phosphorsäure-3-dodecylmercapto-2-decyloxy)propylester
- 10 12. (2'-Desoxy-5-propinyluridin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecyl-mercapto-2-decyloxy)-  
propylester
13. 2'-(9-{{(1-Hydroxymethyl)ethoxy}methyl}guanin)phosphorsäure-(3-dodecyl-  
mercapto-2-decyloxy)propylester
- 15 14. 2'-(9-(Ethoxymethyl)guanin)phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyl-  
oxy)propylester

20 **Beispiel 1:**

**Enzymatische Spaltung von AZT-DMDOP**

10 mg (3'-Desoxy-3'-azidothymidin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecyl-mercapto-2-decyl-  
25 oxy)-propylester (AZT-DMDOP) werden in 0,5 ml 0,1 M Tris-Pufferlösung  
suspendiert und nach Zugabe des Enzyms (0,5 mg bei Phosphodiesterase und 0,1 mg  
bei Phospholipase/Nuclease) 15 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die  
Lösung dünnenschichtchromatographisch untersucht. Nach Zugabe von 5 Tropfen ge-  
sättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung wurde weitere 6 Stunden bei 37 °C inkubiert und an-  
30 schließend die Lösung dünnenschichtchromatographisch untersucht.

Durch Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen Elutionsmitteln wurde die Lösung hinsichtlich der Bildung der möglichen Spaltprodukte (AZT, AZT-monophosphat, DMDOP und Lipidmonophosphat) untersucht.

5 Folgende Enzyme wurden in dem oben genannten Test eingesetzt:

- Phospholipase C aus *Bacillus cereus*, 2000 U/0,5 ml, Boehringer Mannheim GmbH
- Phospholipase D, Typ I, aus Kohl, 150 - 300 U/mg, Sigma
- Phosphodiesterase aus Kalbsmilz, 2 U/mg, Boehringer Mannheim GmbH
- Phosphodiesterase aus Schlangengift, Boehringer Mannheim GmbH
- Nuclease aus *Staphylococcus aureus*, 15 000 U/mg, Boehringer Mannheim GmbH
- LCE (Lipid-Cleavage-Enzyme)

Ergebnis:

Aus der folgenden Tabelle geht hervor, daß nur im Falle der Phospholipase D eine schwache Fluoreszenzauslöschung auf der Höhe des Lipidphosphats festgestellt wird. In keinem der als Referenzenzyme verwendeten Fälle a) - e) konnte die Bildung von AZT oder AZP-monophosphat nachgewiesen werden. Außer dem unveränderten AZT-DMDOP konnte bei diesen Versuchen kein zusätzlicher Fleck im Rahmen der Nachweisgrenze gefunden werden.

20

Enzym	Fluoreszenzauslöschung DC
Phospholipase C	negativ
Phospholipase D	schwach
Phosphodiesterase aus Kalbsmilz	negativ
Phosphodiesterase aus Schlangengift	negativ
Nuclease aus <i>Staphylococcus aureus</i>	negativ
LCE	positiv

**Beispiel 2:****Kommentar zu den Abbildungen**

5    Abb. 1: Diese Abbildung zeigt die Aktivität des LCE, das aus der Membranfraktion von humanen, PHA-stimulierten peripheren Blutleukozyten erhalten wurde, in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Es resultiert ein linearer Zusammenhang zwischen der Proteinkonzentration und der Menge des gebildeten Spaltproduktes DMDOP.

10

15    Abb. 2.: Diese Abbildung zeigt die Substratkinetik (Michaelis-Menten-Kinetik) des LCE, das aus der Membranfraktion von humanen, PHA-stimulierten peripheren Blutleukozyten erhalten wurde.

20    Abb. 3: Diese Abbildung zeigt die Substratkinetik (Michaelis-Menten-Kinetik) des LCE, das aus der Membranfraktion von humanen, PHA-stimulierten peripheren Blutleukozyten [■] und aus ruhenden (nicht stimulierten) peripheren Blutleukozyten [□] erhalten wurde.

25    Abb. 4: Diese Abbildung zeigt die Abhängigkeit der spezifischen Enzymaktivität des LCE, das aus der Membranfraktion von humanen, PHA-stimulierten peripheren Blutleukozyten erhalten wurde, von der Calciumionenkonzentration.

30    Abb. 5: Diese Abbildung zeigt die organ- bzw. gewebsspezifische Verteilung des LCE von Zellmembranpräparationen am unbehandelten Hund.

Abb. 6: Intrazelluläre Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden in stimulierten humanen PBL nach 1, 3, 6 und 24 h Inkubation mit:  
(A) 0.03 µg AZT/ml (■) bzw. 1 µg AZT-DMDOPe/ml (□)  
(B) 0.3 µg AZT/ml (■) bzw. 10 µg AZT-DMDOPe/ml (□)  
(Mittelwerte, n = 2 Bestimmungen)

Abb. 7: Intrazelluläre Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden in nichtstimulierten humanen PBL nach 1, 3, 6 und 24 h Inkubation mit:  
(A) 0.3 µg AZT/ml (■) bzw. 1 µg AZT-DMDOPE/ml (□)  
(B) 0.3 µg AZT/ml (■) bzw. 10 µg AZT-DMDOPE/ml (□)  
(Mittelwerte, n = 2 Bestimmungen)

Abb. 8: Intrazelluläre Konzentrationen an AZT bzw. AZT-Nukleotiden in stimulierten humanen PBL nach 6 und 24 h Inkubation mit  
1 µg AZT-DMDOPE /ml (A) bzw. 10 µg AZT-DMDOPE /ml (B):  
■ Behandlung mit alkalischer Phosphatase  
□ keine Behandlung mit alkalischer Phosphatase  
(Mittelwerte, n = 2 Bestimmungen)

Abb. 9: Intrazelluläre Konzentration an AZT und AZT-Nukleotiden in P3X63Ag8.653-Zellen nach 6, 24 und 48 h Inkubation mit:  
(A) 0.3 µg AZT/ml (■) bzw. 1 µg AZT-DMDOPE /ml (□)  
(B) 0.3 µg AZT/ml (■) bzw. 10 µg AZT-DMDOPE /ml (□)  
(Mittelwerte, n = 2 Bestimmungen)

Abb. 10: Intrazelluläre Konzentrationen an AZT bzw. AZT-Nukleotiden in P3X63Ag8.653-Zellen nach 6 bzw. 24 h Inkubation mit 1 µg BM 21.1290 Na/ml (A) bzw. 10 µg AZT-DMDOPE/ml (B):  
■ Behandlung mit alkalischer Phosphatase  
□ keine Behandlung mit alkalischer Phosphatase  
(Mittelwerte, n = 2 Bestimmungen)

Abb. 11: Intrazelluläre Abklingkinetik von AZT und AZT-Nukleotiden in stimulierten humanen PBL nach 24 h Inkubation mit 0.3 µg AZT/ml /A) bzw. 10 µg AZT-DMDOPE /ml (B). Intrazelluläre Konzentration an AZT und AZT-Nukleotiden 1, 3, 6, 24 und 48 h nach Entfernung der AZT- bzw. AZT-DMDOPE-Inkubationslösung (Mittelwerte, n = 2 Bestimmungen)

Abb. 12: Enymatische Spaltung von [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE durch Membranfraktionen (100 µg Protein/Ansatz) stimulierter humaner PBL. DC-Chromatogramm der n-Heptan-Phase nach Adsorption des Substrates an Kieselgel 60 H und Trennung im IBA-System (2-Propanol:n-Butylacetat:Aqua bidest., 10:6:4, v/v/v) mit Kieselgel 60 als stationärer Phase

Abb. 13: Spezifische Aktivität [pmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>] des LCE in Zellhomogenaten, Zytosol und Membranfraktionen stimulierter humaner PBL (Mittelwert ± SD, n = 6 Bestimmungen)

Abb. 14: Spaltung von AZT-DMDOPE durch die Membranfraktionen stimulierter humaner PBL in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Mittelwert ± SD, n = 3 Bestimmungen)

Abb. 15: Spaltung von AZT-DMDOPE durch die Membranfraktion humaner Monozyten/Makrophagen (stimulierte Monozyten) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Mittelwert, n = 2 Bestimmungen)

Abb. 16: Spezifische Aktivität des LCE durch Membranfraktionen stimulierter und nichtstimulierter humaner PBL sowie humaner Monozyten und Monozyten/Makrophagen (stimulierte Monozyten) (humane PBL: Mittelwert ± SD, n = 6 Bestimmungen) (humane Monozyten: Mittelwert ± SD, n = 4 Bestimmungen)

Abb. 17: Spaltung von AZT-DMDOPE durch Membranfraktionen stimulierter humaner PBL in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Mittelwert ± SD, n = 3 Bestimmungen)

Abb. 18: DC-Chromatogramm von [<sup>14</sup>C]-AZT-DMOPE (A) und von [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE nach enzymatischer Spaltung durch Zellhomogenate von 5 x 10<sup>7</sup> CEM-SS-Zellen (B) nach einer Inkubation von 6 h bei 37 °C. Extraktion der Thioetherlipide mit Diethylether:2-Propanol (9:1, v/v) und Trennung im IBAE-System (2-Propanol:n-Butylacetat:Aqua bidest:Eisessig, 3:5:1:1, v/v/v/v) mit Kieselgel 60 als stationärer Phase

**Beispiel 3:****Einfluß von verschiedenen Enzyminhibitoren oder -aktivatoren auf die LCE-Aktivität**

Inhibitor/Aktivator	Angriffspunkt der Inhibierung/ Aktivierung	LCE Membranfraktion	Einfluß auf LCE- Aktivität
SQ 22536	Adenylat-Cyclase	Niere (Balb/c)	keine
7-Nitroindazol	NO-Synthese	Niere (Balb/c)	keine
RHC-80267	DAG-Lipase	Niere (Balb/c)	keine
Neomycin	PLC, (PLD)	Niere (Balb/c)	keine
Wortmannin	PLD, (PLC)	Niere (Balb/c)	keine
Acetylsalicylsäure	PLC	Niere (Balb/c)	keine
GTP- $\beta$ -S	Gp Aktivator	Niere (Balb/c)	keine
D 609	PLC	Niere (Balb/c) CEM-SS	Stimulation Stimulation

5

**Beispiel 4:****Subzelluläre Fraktionierung**10 a. **Herstellung von Zellhomogenaten, Membran- und Zytosolfraktionen**

Die zur Herstellung von Membran- und Zytosolfraktionen kultivierten Zellen wurden in Polypropylenrörchen (50 ml) überführt und in der Minifuge T bei Raumtemperatur mit 1600 rpm für 10 min sedimentiert. Zur Entfernung von Resten des Kulturmediums wurde das Zellsediment dreimal mit kaltem PBS gewaschen und in Aufschlußpuffer mit einer Zelldichte von  $1 - 5 \times 10^8$  Zellen/ml aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend in einen auf Eis gekühlten Glashomogenisator überführt. Durch mehrmaliges Bewegen eines Teflonkolbens wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen, wobei der Zellaufschluß im Umkehr-Phasenkontrast-Mikroskop optisch kontrolliert wurde. Die aufgeschlossenen Zellen wurden anschließend zur Entfernung der Zellkerne und der nicht aufgeschlossenen Zellen in der Minifuge T bei 4 °C mit 1700 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer

5 Pipette abgehoben und mit 50 mM Tris-Puffer (pH 7.5) auf 10 % (w/v) Saccharose verdünnt. Das Zellhomogenat wurde nach Portionierung bei - 70 °C gelagert oder zur Isolierung von Membran- und Zytosolfraktionen herangezogen. Hierfür wurden 3.2 ml des Zellhomogenates in auf Eis gekühlte, dickwandige Polycarbonatröhrchen (3.2 ml) überführt und in der Beckmann-Tabletop-Ultrazentrifuge mit TLA-100.4 Rotor für 1 h bei 4 °C und 75000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig mit einer Combitip-Pipette abgehoben und die gut sichtbaren Membransedimente mit jeweils 1 ml 50 mM Tris-Puffer (pH 7.5)/10 % Saccharose versetzt. Das Membransediment wurde mit Hilfe einer Spritze (5 ml) mit Kanüle (0.9 x 40 mm) grob homogenisiert.

10 10 Die Grobhomogenate wurden vereinigt und unter Verwendung von Kanülen kleineren Durchmessers (0.8 x 40 mm und 0.45 x 25 mm) fein homogenisiert. Die Membran- und Zytosolfraktionen wurden nach Portionierung bei - 70 °C gelagert.

15 Aufschluß-Puffer 50 mM Tris pH 7.5  
70 % (w/v) Saccharose  
50 µg/ml APMSF

20 Zum Lösen der Saccharose muß der Puffer unter Rühren leicht erwärmt werden.

25 b. Isolierung der Plasmamembran stimulierter humaner peripherer Blutzymphozyten (PBL) (Record et al. (1985), Biochem. Biophys. Acta 8/9 1-9)

30 Humane PBL wurden durch Zentrifugation im isotonischen Dichtegradienten isoliert und mit PHA-M 72 h stimuliert. Zur Entfernung von Resten des Kultivierungsmediums wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und nach Bestimmung der Zellzahl in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und anschließend bei - 70 °C gelagert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch dreimaliges Aufstauen und Einfrieren in Puffer 1, wobei eine Zelldichte von 2.5 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml eingestellt wurde. In Ti60-Zentrifugenröhren (30 ml) wurde eine Mischung aus 11 ml Percoll und 2.13 ml Puffer 2 vorgelegt, welche zuvor mit 70 µl 2 N NaOH auf pH 9 eingestellt wurde. Zur Isolierung der Plasmamembran wurden 4 ml des Homogenates auf die Mischung aufgetragen und anschließend im Ti60-Rotor bei 4 °C und 39000 rpm für 10 min mit ausgeschalteter Bremse in der Beckmann-Ultrazentrifuge L 5 50 fraktioniert. Aus der

oberen Phase der Zentrifugenröhren wurden 1 ml Fraktionen entnommen und mit 2 ml Puffer 3 verdünnt. Die Lösungen wurden anschließend in Ti50-Röhrchen (10.4 ml) überführt und zur Entfernung von Resten des Trennmediums in der Beckmann-Ultrazentrifuge L 5 50 mit Ti50-Rotor bei 4 °C und 45000 rpm für 45 min zentrifugiert. Die Überstände wurden mit einer Pipette abgehoben, fraktioniert, in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei - 70 °C gelagert. Die Charakterisierung der Fraktionen erfolgte durch Bestimmung des Proteingehaltes und der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase.

10	<u>Puffer 1</u>	100 mM	KCl
		5 mM	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
		1 mM	ATP
		2 mM	(4-Aminophenyl)-methansulfonylfluorid (APMSF)
		25 mM	Tris pH 9.6
15	<u>Puffer 2</u>	400 mM	KCl
		20 mM	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
		400 mM	Tris pH 9.6
20	<u>Puffer 3</u>	100 mM	KCl
		5 mM	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
		50 mM	Tris pH 7.42

25 **Beispiel 5:**

Herstellung von Substratlösungen für den LCE-Assay

Als Substrat wurde im LCE-Assay ein Gemisch aus [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE und 30 nichtradioaktiv markiertem AZT-DMDOPE eingesetzt.

Ausgehend von einer [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE Stammlösung wurde durch Verdünnung mit Ethanol eine Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 83.27 kBq/ml hergestellt. Die ethanolische Lösung konnte bei 4 °C unter Inertgas für 2 Monate gelagert werden.

In einem getrennten Ansatz wurde die nichtradioaktiv markierte Komponente des Substanzgemisches hergestellt. Hierfür wurde in Ethanol eine Lösung von AZT-DMDOPE mit einer Konzentration von 1  $\mu$ mol/ml angesetzt und für 1 min im Eis/Wasserbad mit dem Ultraschallstab bei 30 % Energieabgabe kontinuierlich beschallt.

5

Zur Herstellung des Substratgemisches aus radioaktivem und nichtradioaktivem AZT-DMDOPE wurden aus diesen ethanolischen Lösungen pro Ansatz 1.67 kBq an radioaktiv markiertem [ $^{14}\text{C}$ ]-AZT-DMDOPE und 0.7 - 5 nmol der nichtmarkierten Verbindung in ein Glasrörchen (10 ml) überführt. Das Lösungsmittel wurde im  $\text{N}_2$ -Strom evapiert und 10 AZT-DMDOPE in einem geeigneten Volumen an Aqua bidest. aufgenommen und für 1 min unter Kühlung im Eis/Wasserbad bei 30 % Energieabgabe kontinuierlich beschallt.

10

**Beispiel 6:**

15 **Lipid-Cleavage-Enzyme (LCE)-Assay**

Zur Untersuchung der enzymatischen Spaltung in Abhängigkeit von der Zeit und der Proteinkonzentration wurden üblicherweise 5 nmol AZT-DMDOPE und 0.98 nmol [ $^{14}\text{C}$ ]-

20 AZT-DMDOPE (1.67 kBq) in einem Volumen von 200  $\mu$ l Aqua bidest. im LCE-Assay eingesetzt. Das Pipettierschema ist in der folgenden Tabelle angegeben.

20

**Tabelle Pipettierschema für den LCE-Assay zur Bestimmung des Umsatzes von AZT-DMDOPE**

	Reaktionsansatz	Kontrolle
<b>EGTA [20 mM]</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>Tris, pH: 8.0 [1 M] [µl/Ansatz]</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>AZT-DMDOPE /[<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE [nmol/Ansatz] [µl/Ansatz]</b>	<b>0.10 - 5.98</b> <b>5 - 200</b>	<b>0.10 - 5.98</b> <b>5 - 200</b>
<b>Protein [mg/Ansatz] [µl/Ansatz]</b>	<b>0.0125 - 0.2</b> <b>x</b>	<b>-</b> <b>-</b>
<b>Aqua bidest. [µl]</b>	<b>ad 500</b>	<b>ad 500</b>

5 Zur Untersuchung der enzymatischen Spaltung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wurde eine Substratstammlösung von 0.98 nmol [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE und 0.7 nmol AZT-DMDOPE/80 µl Aqua bidest. im LCE-Assay angesetzt. Die verschiedenen Substratkonzentrationen im LCE-Assay wurden durch kontinuierliche Verdopplung bzw. Halbierung des Volumens an Substratlösung eingestellt. Die Ansätze 10 wurden in Glasrörchen (5 ml) vorgelegt und durch Zugabe der Substratlösung gestartet. Die Inkubation wurde bei 37 °C im Wasserbad unter leichtem Schütteln durchgeführt.

**Beispiel 7:**

15

**Extraktion von DMDOP aus wäßriger Matrix**

Die Reaktionsansätze des LCE-Assays wurden nach entsprechender Inkubationszeit dem Wasserbad entnommen, und die Reaktion durch Zugabe von 750 µl 2-Propanol gestoppt.

Nach gründlicher Durchmischung wurden die Ansätze anschließend mit 700 µl auf Raumtemperatur erwärmtem n-Heptan versetzt. Die Ansätze wurden erneut für 30 sec gut gemischt und zur Beschleunigung der Phasentrennung in der Minifuge T bei 3200 rpm für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl der oberen Phase (n-Heptan) entnommen und in neue Glasrörchen (5 ml) mit 10 mg Kieselgel 60 H und 200 µl n-Heptan überführt. Die Ansätze wurden für 30 sec gut durchmischt und zur Sedimentation des Kieselgels für 10 min unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Vom Überstand wurden anschließend 500 µl entnommen und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte für 4 min im Flüssigkeits-Szintillations-Analysator. Zur Bestimmung des Absolutwertes an Radioaktivität wurden 200 µl der Substratlösung mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und unter gleichen Bedingungen im Flüssigkeits-Szintillations-Analysator gemessen.

15

**Beispiel 8:**

10  
15  
20

**In-vitro-Pharmakokinetikstudien mit AZT-DMDOPe und AZT**

a. **Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen an AZT und/oder AZT-Nukleotiden in stimulierten und nichtstimulierten humanen PBL nach Inkubation mit AZT-DMDOPe bzw. AZT**

25

Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen an AZT und/oder AZT-Nukleotiden nach Inkubation mit AZT-DMDOPe bzw. AZT wurden humane PBL aus "Buffy coat" isoliert.

30  
35

Hierfür wurde "Buffy-coat" von gesunden Spendern gemischt und durch Zentrifugation in einem isotonischen Medium mit einer Dichte von 1.077 g/ml fraktioniert. Da mononukleare Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten) eine geringere Dichte als Erythrozyten und polymorphe Granulozyten haben, bilden sie einen Ring an der Grenze zwischen Trennmedium und Probe und können mit Hilfe einer Pipette abgenommen werden. Erythrozyten und polymorphe Granulozyten sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte durch das Medium und lassen sich somit von PBL separieren.

Zur Stimulation der Zellproliferation wurde Phytohämagglutinin A (Mukoprotein) (PHA-M), der mitogene Lektinextrakt aus der roten Feuerbohne (*Phaseolus vulgaris*), eingesetzt. Phytohämagglutinin ist eine Familie von 5 Isolektinen, die als Tetramere vorliegen. Die Untereinheiten bestehen aus einem lymphozytenreaktiven Typ-L und einem erythrozytenreaktiven Typ-E. Typ-L hat eine hohe Affinität zu Lymphozytenoberflächenrezeptoren und ist somit verantwortlich für die mitogenen Eigenschaften. Die Stimulation der Lymphozyten wurde in KPMI 1640 Komplettmedium III für 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt. Nach Beendigung der Stimulation wurden zur Erhöhung der Zellzahl die Zellen für weitere 24 h in RPMI 1640 Komplettmedium IV kultiviert.

Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden wurden die Zellen in RPMI 1640 Komplettmedium II mit einer Dichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in Gewebekulturflaschen (50 ml/25 cm<sup>2</sup>) überführt, und in Anwesenheit von 0.03 bzw. 0.3 µg AZT/ml (Charge 15) und 1 bzw. 10 µg AZT-DMDOPe/ml für 1 - 24 h inkubiert.

Die Konzentrationen an AZT-DMDOPe und AZT orientierten sich hierbei an den IC<sub>50</sub>-Werten für die antiretrovirale Wirksamkeit, die für AZT und AZT-DMDOPe in HIV-1-infizierten humanen PBL ermittelt wurden.

Die Kulturen wurden anschließend für 1, 3, 6 und 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. AZT und seine Nukleotide wurden anschließend mit 60 % Methanol extrahiert. Die extrahierten Nukleotide wurden mit alkalischer Phosphatase quantitativ zu AZT dephosphoryliert, da nur AZT, nicht jedoch die entsprechenden Nukleotide mit Hilfe eines Radioimmuno-Assays detektiert werden kann.

Die Konzentrationen an intrazellulärem AZT, die mit Hilfe des Radioimmuno-Assays bestimmt wurden, setzten sich dementsprechend aus der des AZT und den der AZT-Nukleotide zusammen. Eine separate Quantifizierung der Konzentrationen an AZT-MP, AZT-DP und AZT-TP wurde nicht durchgeführt. Experimentelle Beobachtungen an stimulierten PBL konnten eine im Vergleich zu AZT-DP und AZT-TP um Faktor 40 höhere Konzentration an AZT-MP belegen (Arnér et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267,

10968-10975). Entsprechend kann angenommen werden, daß sich die Nukleotidfraktion fast ausschließlich aus AZT-MP zusammensetzt.

5 In stimulierten humanen PBL wurden bei Inkubation mit 0.03 bzw. 0.3 µg AZT/ml maximale Konzentrationen von 2.90 bzw. 30.97 ng/10<sup>6</sup> Zellen nach einer Inkubation von 6 bzw. 3 h erreicht (Abb. 6). Die Konzentrationen fielen anschließend bei zunehmender Inkubationszeit auf 2.32 bzw. 19.88 ng/10<sup>6</sup> Zellen ab. Nach Inkubation mit 1 bzw. 10 µg AZT-DMDOPE/ml zeigte sich ein über die gesamte Inkubationszeit stetig steigender intrazellulärer Spiegel an AZT und seiner Nukleotiden. Nach 24 h Inkubation mit AZT-DMDOPE und AZT waren die intrazellulären Spiegel identisch. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß nach einer Inkubationszeit von 18 - 48 h die intrazellulären Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden nach Inkubation mit AZT-DMDOPE sogar größer sind als nach Inkubation mit der äquipotenten Konzentration an AZT.

10 15 Bei nichtstimulierten humanen PBL kehrten sich die Verhältnisse um (Abb. 7). So waren die intrazellulären Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden nach Inkubation mit AZT-DMDOPE über die gesamte Inkubationszeit größer als nach Inkubation mit der äquipotenten Konzentration an AZT. Nach Inkubation mit 1 bzw. 10 µg AZT-DMDOPE/ml wurden maximale intrazelluläre Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden von 0.62 bzw. 4.74 ng/10<sup>6</sup> Zellen erreicht, während nach Inkubation mit 0.03 bzw. 0.3 µg AZT/ml Konzentrationen von 0.10 bzw. 0.47 ng/10<sup>6</sup> Zellen detektiert werden konnten.

20 25 Zur separaten Quantifizierung von AZT und den AZT-Nukleotiden nach Inkubation mit BM 21.1290 Na wurden alle intrazellulären Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden mit und ohne Behandlung mit alkalischer Phosphatase bestimmt. Diese Experimente wurden an stimulierten humanen PBL durchgeführt.

30 Hierfür wurden Zellsuspensionen mit einer Dichte von 10<sup>6</sup> Zellen/ml mit 1 bzw. 10 µg AZT-DMDOPE/ml für 6 bzw. 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die maximalen intrazellulären Konzentrationen an freiem AZT nach Inkubation mit 1 bzw. 10 µg AZT-DMDOPE/ml wurden nach 6 bzw. 24 h mit 0.03 bzw. 0.15 ng/10<sup>6</sup> Zellen detektiert

(Abb. 8). Wurden nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase zusätzlich die phosphorylierten intrazellulären AZT-Nukleotide erfaßt, so wurden nach 24 h maximale Konzentrationen von 3.85 bzw. 6.41 ng/10<sup>6</sup> Zellen gefunden.

5

b. Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen an AZT und/oder AZT-Nukleotiden in P3X63Ag8.653-Zellen nach Inkubation mit AZT-DMDOPE bzw. AZT

10 Die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden in Thymidikinasedefizienten Zellen sollte weitere Erkenntnisse über die intrazelluläre Spaltung der Testsubstanz AZT-DMDOPE liefern. Intrazelluläres AZT kann in diesen Zellen aufgrund eines Mangels an Thymidin-Kinase (TK) nicht in ATZ-MP und somit in das therapeutisch wirksame AZT-TP überführt werden. Die Bestimmung der 15 intrazellulären Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden nach Inkubation mit AZT-DMDOPE könnte somit einen weiteren Hinweis auf die Spaltung der Testsubstanz geben.

20 Hierfür wurden in Gewebekulturschalen (60 x 15 mm) 1 x 10<sup>7</sup> Zellen in RPMI 1640 Komplettmedium I mit 0.03 bzw. 0.3 µg AZT/ml und 1 bzw. 10 µg AZT-DMDOPE/ml über 6, 24 und 48 h inkubiert. Nach Extraktion von AZT und der AZT-Nukleotide und einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase wurde die Konzentration an AZT mit Hilfe des Radioimmuno-Assays bestimmt.

25 Der graphischen Auftragung der Versuchsergebnisse ist zu entnehmen, daß die intrazellulären Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden mit AZT-DMDOPE deutlich höher waren als nach Inkubation mit äquipotenten Konzentrationen an AZT. So wurden nach 6 h Inkubation mit 1 bzw. 10 µg AZT-DMDOPE/ml maximale Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden von 0.55 bzw. 4.40 ng/10<sup>6</sup> Zellen erreicht (Abb. 9).

30

Die maximalen intrazellulären Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden nach Inkubation mit 0.03 bzw. 0.3 µg AZT/ml wurden nach 48 h mit 0.03 bzw. 0.31 ng/10<sup>6</sup> Zellen bestimmt.

Zur Quantifzierung der Anteile an phosphoryliertem AZT wurden die intrazellulären Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotide vor und nach einer Behandlung der zellulären Extrakte mit alkalischer Phosphatase verglichen. Die Substanzspiegel an phosphoryliertem AZT nach Inkubation mit 1 bzw. 10 µg AZT-DMDOPE/ml ergaben hierbei Werte von 0.48 bzw. 2.42 ng/10<sup>6</sup> Zellen (Abb. 10). Wurde nur AZT erfaßt, so wurden nach 24 h maximale Konzentrationen von 0.05 bzw. 1.10 ng/ml erreicht. Die Unterschiede in den intrazellulären Konzentrationen an AZT-Nukleotiden nach Inkubation mit AZT und AZT-DMDOPE können durch eine intrazelluläre Spaltung der Testsubstanz AZT-DMDOPE zu AZT-MP erklärt werden.

10

c. Abklingkinetik von AZT und AZT-Nukleotiden in stimulierten humanen PBL nach Inkubation mit AZT-DMDOPE bzw. AZT

Stimulierte humane PBL wurden für 24 h mit 0.3 µg AZT/ml bzw. 10 µg AZT-DMDOPE/ml inkubiert. Anschließend wurden 1 x 10<sup>7</sup> Zellen in Gewebekulturflaschen (50 ml/25 cm<sup>2</sup>) mit RPMI 1640 Komplettmedium I überführt. Nach 1, 3, 6, 24 und 48 h wurde AZT und die AZT-Nukleotide aus der zellulären Matrix extrahiert. Nach einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase wurde mit Hilfe des Radioimmuno-Assays die Konzentration an AZT bestimmt.

20

Der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse ist zu entnehmen, daß nach Inkubation der Zellen mit AZT die intrazellulären Konzentrationen an AZT und AZT-Nukleotiden rasch abfallen und nach 6 h einen konstanten Wert von 0.40 ng/10<sup>6</sup> Zellen erreichen. Bei Inkubation mit einer äquipotenten Konzentration an AZT-DMDOPE hingegen nehmen die AZT bzw. AZT-Nukleotide weniger stark ab und erreichen nach 3 h bei einer wesentlich höheren Konzentration einen über 48 h konstanten Wert von 1.80 ng/10<sup>6</sup> Zellen (Abb. 11). Da nichtphosphoryliertes AZT durch mehrmaliges Waschen mit PBS aus der Zelle entfernt wurde sind die intrazellulären Konzentrationen hauptsächlich auf phosphorylierte AZT-Nukleotide zurückzuführen. Eine Inkubation mit AZT-DMDOPE stellt somit, im Vergleich zu einer äquipotenten Konzentration an AZT, der Zelle eine um Faktor 4.5 höhere Konzentration an phosphoryliertem AZT zur Verfügung. Diese großen Unterschiede in den zellulären Konzentrationen an AZT-Nukleotiden nach Inkubation mit AZT-DMDOPE und AZT können durch eine direkte

intrazelluläre Spaltung des Thioetherlipid-AZT-Konjugates AZT-DMDOPE zu AZT-MP und dem korrespondierenden Thioetherlipidteil DMDOP erklärt werden.

**Beispiel 9:**

5

**Charakterisierung des AZT-DMDOPE - spaltenden Enzyms/Enzymsystems (LCE)**

Untersuchungen zur enzymatischen Spaltung von AZT-DMDOPE durch Zellhomogenate humaner PBL und CEM-SS-Zellen konnten zeigen, daß AZT-DMDOPE zu DMDOP und 10 AZT-MP metabolisiert wird. Die Charakterisierung des LCE war Ziel der folgenden Untersuchungen. So wird die enzymatische Spaltung von AZT-DMDOPE in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration, der Inkubationszeit und zweiwertiger Metallkationen untersucht. In Abhängigkeit verschiedener Substratkonzentrationen wird in enzymkinetischen Untersuchungen die apparenten Michaelis-Menten-Parameter  $K_M$  und 15  $v_{max}$  bestimmt.

Für diese Untersuchungen ist ein Enzym-Assay etabliert, in dem AZT-DMDOPE und  $[^{14}\text{C}]\text{-AZT-DMDOPE}$  als Substrat eingesetzt wurde (Beispiel 6). Bei protein- und zeitabhängigen Messungen wurden 5 nmol AZT-DMDOPE und 0.98 nmol (1.67 kBq)  $[^{14}\text{C}]$ -AZT-DMDOPE /Ansatz verwendet. Bei substratabhängigen Umsetzungen wurde eine Stammlösung von 0.98 nmol  $[^{14}\text{C}]\text{-AZT-DMDOPE}$  und 0.7 nmol AZT-DMDOPE /80  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Die verschiedenen Substratkonzentrationen wurden anschließend durch kontinuierliche Verdopplung bzw. Halbierung des Volumens an Substratlösung eingestellt.

25 Als Enzymquelle können z. B. Zellhomogenate, Zytosol- und Membranfraktionen bekannter Proteinkonzentrationen von verschiedenen humanen Zellen eingesetzt werden.

a. **Isolierung und Quantifizierung von DMDOP nach enzymatischer Spaltung von AZT-DMDOPE**

30

Die Quantifizierung der enzymatischen Spaltung von AZT-DMDOPE wurde durch eine zweistufige Extraktion des Metaboliten DMDOP mit n-Heptan und anschließender Adsorption von Resten des Substrates AZT-DMDOPE an Kieselgel 60 H durchgeführt.

Hierbei wurden die Reaktionsansätze mit 2-Propanol und n-Heptan versetzt, wobei sich das im Vergleich zum Substrat unpolare DMDOP in der n-Heptan-Phase anreichert. Die n-Heptan-Phase wurde dann mit Kieselgel 60 H versetzt, wobei Reste des Substrates AZT-DMDOPE adsorbiert werden. Die n-Heptan-Phase wurde anschließend durch Zentrifugation vom Kieselgel separiert, in 3 ml Aqua luma überführt und die in ihr enthaltene Menge an radioaktiv markiertem DMDOP im Flüssigkeits-Szintillations-Analysator über einen Zeitraum von 5 min bestimmt. Aus diesen Ergebnissen konnte die prozentuale Umsetzung des Substrates AZT-DMDOPE zu DMDOP und die spezifische Aktivität des LCE errechnet werden. Als spezifische Aktivität wurde hierbei die Menge an DMDOP bezeichnet die pro 1 mg Protein der eingesetzten Zellpräparationen pro Minute gebildet wurde.

Zur Überprüfung der selektiven Extraktion von DMDOP aus dem Reaktionsgemisch wurden Optimierungsexperimente mit Membranfraktionen stimulierter humaner PBL durchgeführt. Die Proteinkonzentration war hierbei 100 µg/Ansatz. Parallel wurden Ansätze ohne Protein mitgeführt. Nach der Extraktion wurde die n-Heptan-Phase im N<sub>2</sub>-Strom evaporiert, und die Rückstände in einem Gemisch aus Methanol und Essigsäureethylester (1:1, v/v) aufgenommen.

Die dünnenschichtchromatographische Analyse erfolgte im IBA-System. Der Reaktionswert ließ hierbei nur den Peak der Muttersubstanz [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE erkennen. Im Reaktionsansatz wurde ein Substanzpeak am Ende der Laufmittelfront detektiert, der aufgrund des R<sub>f</sub>-Wertes eindeutig als der Metabolit [<sup>14</sup>C]-DMDOP identifiziert werden konnte (Abb. 12). Der Peak, der unmittelbar vor dem DMDOP-Substanzpeak läuft, kann keiner der bekannten Verbindungen zugeordnet werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine Verbindung, die durch Oxidation des Schwefels im Thioetherlipidteil von DMDOP entstanden ist. Durch eine Extraktion mit n-Heptan konnte somit eine Isolation des enzymatischen Spaltproduktes DMDOP aus dem Enzym-Assay durchgeführt werden. Eine einfache und schnelle Quantifizierung des aus AZT-DMDOPE freigesetzten Metaboliten DMDOP war somit gewährleistet.

b. Spaltung von AZT-DMDOPE durch Zellhomogenate, Membran- und Zytosolfraktionen stimulierter humaner PBL

5 In einer ersten Versuchsreihe wurde die enzymatische Spaltung von AZT-DMDOPE durch Zellhomogenate sowie durch Zytosol- und Membranfraktionen stimulierter humaner PBL untersucht.

10 Nach Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellhomogenaten, Zytosol- und Membranfraktionen mit Hilfe des Bicinchoninsäure(BCS)-Tests wurden 0.025 - 0.20 mg Protein/Ansatz eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 2 h bei 37 °C inkubiert, anschließend das Produkt DMDOP durch Extraktion mit n-Heptan aus den Ansätzen isoliert und die spezifische Aktivität des LCE bestimmt (Abb. 13).

15 Die AZT-DMDOPE-spaltende Aktivität war im Zellhomogenaten und in den Zytosolfraktionen mit  $6.48 \pm 0.38$  ( $n = 6$ ) und  $1.65 \pm 0.40$  pmol mg $^{-1}$  min $^{-1}$  ( $n = 6$ ) um Faktor 1.59 bzw. 6.3 kleiner als die spezifische Aktivität in den Membranfraktionen mit  $14.23 \pm 0.70$  ( $n = 6$ ) pmol mg $^{-1}$  min $^{-1}$ . Bei Isolierung der Membranfraktionen kommt es offensichtlich zu einer Anreicherung des LCE. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in den sich anschließenden Experimenten zur Bestimmung der enzymatischen 20 Parameter des LCE Membranfraktionen eingesetzt.

25 Die Membranfraktion, die durch den mechanischen Aufschluß der Zellen und anschließender Ultrazentrifugation des Zellhomogenates gewonnen wurde, stellt ein Gemisch aus Fragmenten der Plasma- und Kernmembran sowie der Membranen der Zellorganellen dar.

30 Eine Differenzierung der verschiedenen Membranfragmente war durch Ultrazentrifugation eines Zellhomogenates im Percoll-Dichtegradienten und einer sich anschließenden Charakterisierung durch den Plasmamembranmarker alkalische Phosphatase möglich.

Zur Isolierung der Plasmamembranen wurden 2 ml einer Zellsuspension stimulierter humaner PBL mit einer Zelldichte von  $2.5 \times 10^8$  Zellen/ml durch dreimaliges Einfrieren

und Auftauen aufgeschlossen und durch Zentrifugation im Percoll-Dichtegradienten fraktioniert. Dem Zentrifugat wurden 10 Fraktionen (1 ml) entnommen, Reste des Trennmediums entfernt und in den einzelnen Fraktionen die Aktivität der alkalische Phosphatase mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat bei 305 nm gemessen.

5

Die höchste Aktivität an alkalischer Phosphatase war in Fraktion 8 zu bestimmen. Die Absorption der verbleibenden Fraktionen war wesentlich geringer.. Dies weist auf eine Anreicherung der Plasmamembranen in Fraktion 8 hin. In jeder Fraktion wurde nach Bestimmung der Proteinkonzentration die spezifische LCE-Aktivität ermittelt. Hierfür wurde eine Proteinkonzentration von 0.05 mg/Ansatz eingestellt und die Reaktionsansätze bei 37 °C für 2 h inkubiert. Die höchste spezifische LCE-Aktivität von 4.40 pmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> min konnte hierbei in Fraktion 8 bestimmt werden.

10

In allen weiteren Fraktionen wurden geringere spezifische Aktivitäten von 1.10 - 1.90 pmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> gemessen (Abb. 4.32). Die höchste spezifische Aktivität des LCE wurde somit in der Fraktion bestimmt, die gleichzeitig die höchste Aktivität an alkalischer Phosphatase aufweist. Dieser Befund zeigt somit das Vorkommen des LCE in der Fraktion mit dem höchsten Anteil an Fragmenten der Plasmamembran an.

15

20 c. Abhängigkeit der spezifischen LCE-Aktivität von der Proteinkonzentration

In weiterführenden Untersuchungen sollte die Umsetzung von AZT-DMDOPE in Abhängigkeit steigender Proteinkonzentrationen der Zellpräparationen bestimmt werden.

25

Hierbei wurden Membranfraktionen stimulierter und nichtstimulierter humaner PBL sowie humaner Blutmonozyten verwendet. Die Umsetzung von AZT-DMDOPE zu DMDOP durch die Membranfraktionen stimulierter humaner PBL wies beim Einsatz von 0.025 - 0.2 mg Protein/Ansatz lineares Verhalten auf (Abb. 14). Die spezifische LCE-Aktivität betrug 14.23 ± 0.7 pmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (n = 6) (Abb. 16). Bei der Umsetzung von AZT-DMDOPE durch Proteine der Membranfraktion nichtstimulierter humaner PBL zeigte sich eine lineare Abhängigkeit nur im Konzentrationsbereich bis zu 0.05 mg Protein/Ansatz. Bei höheren Proteinkonzentrationen war keine Linearität mehr

30

gegeben. Die spezifische LCE-Aktivität, die aus den Umsetzungen im linearen Bereich berechnet wurde, betrug  $1.45 \pm 0.32 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $n = 6$ ).

5 Zur Bestimmung der spezifischen LCE-Aktivität in humanen Blutmonozyten wurden diese im hypertonischen Dichtegradienten isoliert. Monozyten haben mit 1.068 g/ml im Durchschnitt eine etwas geringere Dichte als Lymphozyten mit 1.070 g/ml. Dieser Unterschied in der Dichte ist allerdings sehr gering, so daß eine Trennung dieser Blutzellen in einem isotonischen Gradienten nicht möglich ist.

10 Unter hypertonischen Bedingungen verlieren Lymphozyten schneller Wasser als Monozyten, resultierend in einer Zunahme ihrer Dichte. In einem hypertonischen Trennmedium ist es deshalb möglich, Monozyten aus Vollblut oder leukozytenreichem Plasma zu isolieren. Eine Isolierung humaner Blutmonozyten ist ebenfalls aus "Buffy coat" möglich. Hierbei wurden mononukleare Zellen unter isotonischen Bedingungen im 15 Dichtegradienten getrennt und Monozyten anschließend in Gewebekulturflaschen ( $175 \text{ cm}^2/800 \text{ ml}$ ) durch ihre Adhärenz separiert.

20 Mit Hilfe der durchflußzytofluometrischen Analyse konnte nach Bestimmung von Größe und Granularität sowie nach spezifischer Antikörperfärbung eine Stimulation dieser Zellen durch Adhärenz nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Stimulation wurden die Monozyten, die durch Adhärenz am Boden der Gewebekulturflaschen isoliert wurden, im folgenden als Monozyten/Makrophagen (stimulierte Monozyten) bezeichnet.

25 Bei enzymatischen Umsetzungen von AZT-DMDOPC durch die Membranfraktion humaner Monozyten, die im Verlauf ihrer Isolierung durch Adhärenz stimuliert wurden, konnte eine lineare Abhängigkeit bis zu einer Konzentration von 0.1 mg Protein/Ansatz festgestellt werden (Abb. 15). Die spezifische Aktivität betrug  $8.8 \pm 0.26 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $n = 4$ ) (Abb. 16). Wurden die Monozyten direkt im hypertonischen Dichtegradienten isoliert, so zeigt sich bei der enzymatischen Spaltung lineares Verhalten nur bis zu einer Proteinkonzentration von 0.025 mg Protein/Ansatz. Bei höheren Proteinkonzentrationen blieb der Substratumsatz nahezu konstant. Die spezifische Aktivität wurde analog zu Umsetzungen mit Membranfraktionen

nichtstimulierter humaner PBL aus dem linearen Bereich berechnet und betrug  $3.2 + 0.60 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $n = 4$ ).

5 Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bei der Umsetzung von AZT-DMDOPE durch Enzyme der Membranfraktionen stimulierter humaner PBL und Monozyten höhere spezifische LCE-Aktivitäten beobachtet wurden als bei Umsetzung von AZT-DMDOPE durch Membranfraktionen nichtstimulierter Zellen (Abb. 16).

10 d. Abhängigkeit der spezifischen LCE-Aktivität von der Inkubationszeit

15 Die enzymatische Spaltung der Versuchssubstanz AZT-DMDOPE in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurde mit Membranfraktionen stimulierter humaner PBL als Enzymquelle durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden 0.5, 1, 2, 3, und 6 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die Menge des Metaboliten DMDOP bestimmt. Nach graphischer Auftragung der Versuchsergebnisse konnte gezeigt werden, daß die Umsetzung von AZT-DMDOPE zu DMDOP über den gesamten Zeitraum der Inkubation von 0.5 - 6 h Linearität zu erkennen ist (Abb. 17).

20 e. Abhängigkeit der spezifischen LCE-Aktivität von zweiwertigen Metallkationen

25 Die Abhängigkeit der enzymatischen Spaltung von AZT-DMDOPE durch das LCE von zweiwertigen Metallkationen wurde mit Membranfraktionen stimulierter humaner PBL als Enzymquelle untersucht.

25 Die zweiwertigen Metallkationen wurden in einer Konzentration von 2 mM im LCE-Assay eingesetzt. Die Proteinkonzentration wurde mit 0.068 mg/Ansatz festgelegt.

30 Parallel wurde ein Ansatz mit EGTA mitgeführt. EGTA ist ein spezifischer Komplexbildner für  $\text{Ca}^{2+}$  das essentiell für die Aktivität der Phospholipase C ist. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C wurde der Umsatz der Muttersubstanz gemessen und die spezifische Aktivität des LCE bestimmt (folgende Tabelle).

**Tabelle: Spaltung von AZT-DMDOP durch Membranfraktionen stimulierter humaner PBL in Abhängigkeit von EGTA und zweiwertigen Metallkationen (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3 Bestimmungen)**

Effektor [2 mM]	DMDOP [pmol]	Spezifische Aktivität [pmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ]	Inhibition [%]
EGTA	84.96 $\pm$ 11.18	10.41 $\pm$ 1.37	$\equiv$ 0
CaCl <sub>2</sub>	50.50 $\pm$ 2.13	6.19 $\pm$ 0.26	41.0 $\pm$ 2.5
MgCl <sub>2</sub>	84.36 $\pm$ 17.02	10.34 $\pm$ 2.08	0
ZnCl <sub>2</sub>	0	0	100.0
MnCl <sub>2</sub>	4.75 $\pm$ 0.63	0.58 $\pm$ 0.08	94 $\pm$ 1

5

Die höchste spezifische Aktivität wurde bei Verwendung von EGTA und MgCl<sub>2</sub> mit 10.41  $\pm$  1.37 (n = 3) bzw. 10.34  $\pm$  2.08 pmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (n = 3) erreicht. Innerhalb der Meßgenauigkeit konnte also keine Inhibition durch MgCl<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Wurde im Enzym-Assay die CaCl<sub>2</sub> eingesetzt, so konnte eine spezifische Aktivität von 6.19  $\pm$  0.26 pmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (n = 3) bestimmt werden. Dies bedeutet im Vergleich zum Ansatz mit EGTA eine Hemmung der LCE-Aktivität von 41.0  $\pm$  0.25 % (n = 3). Bei ZnCl<sub>2</sub> war innerhalb der Meßgenauigkeit kein DMDOP nachweisbar. ZnCl<sub>2</sub> und MnCl<sub>2</sub> führen zu einer totalen Hemmung der Umsetzung von AZT-DMDOP zu DMDOP und AZT-MP.

10

f. Bestimmung der apparenten Michaelis-Menten-Parameter K<sub>M</sub> und v<sub>max</sub>

Zur Bestimmung der apparenten Michaelis-Menten-Parameter für das LCE wurde die enzymatische Spaltung von AZT-DMDOP in Abhängigkeit steigender Substratkonzentrationen untersucht.

**Tabelle:** *Apparente Michaelis-Menten-Parameter  $K_M$  und  $v_{max}$  des LCE in stimulierten und nichtstimulierten humanen PBL sowie humanen Monozyten und Monozyten/Makrophagen (stimulierte Monozyten)*

	$v_{max}$ [pmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [μM]
nichtstimulierte humane PBL	2.03 ± 0.19	5.51 ± 0.99
stimulierte humane PBL	15.29 ± 0.37	2.26 ± 0.16
humane Monozyten	1.61 ± 0.37	12.08 ± 4.13
humane Monozyten/Makrophagen (stimulierte Monozyten)	9.09 ± 0.44	4.63 ± 0.45

5

Hierfür wurden Membranfraktionen stimulierter und nichtstimulierter humaner PBL sowie humaner Monozyten und Monozyten/Makrophagen (stimulierte Monozyten) eingesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten eine konstante Proteinmenge von 0.068 mg/Ansatz und wurden bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die 10 Menge des Metaboliten DMDOP bestimmt.

**Beispiel 10:**

**Versuchstiere**

15

Zur Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter der Versuchssubstanz AZT-DMDOPE wurden *In-vivo*-Experimente an weiblichen Balb/c-Mäusen (Charles River Wiga, Sulzfeld; Bormholtgard, Ry (Dänemark); Iffa Credo, L'Abresle (Frankreich)) durchgeführt. Die Tierlieferungen wurden vor Versuchsbeginn auf Virusantikörper (Mäuse Hepatitisvirus, Reo-Virus, Paro-Virus) untersucht. In den Versuchen wurden nur Tiere eingesetzt, deren Antikörpertiter negativ war.

**Versuchstierhaltung**

25 Die Tierhaltung erfolgte in vollklimatisierten Tierställen mit einer Raumtemperatur von 22 - 24 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 - 70 % und einem Tag-Nacht-Rhythmus von

12 Stunden. Durch Laminarflowboxen wurde im Tierstall 15 - 20 mal pro Stunde ein Luftaustausch gewährleistet. Den Tieren wurde eine Standarddiät (Ssniff, Soest) und über eine Flaschentränke Wasser *ad libitum* verabreicht.

5 **Beispiel 11:**

**Zellkulturmethoden**

a. **Kryokonservierung von Zelllinien**

10

Zur Kryokonservierung wurden Zellen in RPMI 1640 Medium auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 10 min bei 1600 rpm in der Minifuge T sedimentiert. Anschließend wurde das Zellsediment in einem gleichen Volumen an Kryokonservierungsmedium aufgenommen. Nach Resuspension des Zellsediments wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen (1.8 ml) überführt und für 24 h bei -70 °C eingefroren. Zur endgültigen Lagerung wurden die Kryoröhrchen in einen Thermobehälter mit flüssigen N<sub>2</sub> überführt.

20

**Kryokonservierungsmedium** 60 % (v/v) RPMI 1640 Medium

0.05 mM 2-Mercaptoethanol

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

30 % (v/v) Fötales Kälberserum

10 % (v/v) DMSO

25

b. **Stammkulturhaltung und Aufzuchtbedingungen**

**Kultivierung von CEM-SS-Zellen**

30

Die Kultivierung der Suspensionszelllinie CEM-SS erfolgte in RPMI 1640 Komplettmedium I. Hierfür wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in eine Gewebekulturflasche (83 cm<sup>2</sup>/260 ml) mit 50 ml Medium überführt. Anschließend wurde die Kultur für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Zellpassage wurden die Zellen mit einer

5

sterilen Pipette der Gewebekulturflasche entnommen und in der Minifuge T für 10 min bei 1600 rpm sedimentiert. Nach Resuspension der Zellen in Kultivierungsmedium und Bestimmung der Zellzahl durch Eosinfärbung in der Neubauer-Zählkammer wurden  $1 \times 10^7$  Zellen zur Passage in 50 ml frisches Medium eingesetzt.

#### Kultivierung von P3X63Ag8.653-Zellen

10 Die Kultivierung von P3X63Ag8.653-Zellen erfolgte als Monolayer in RPMI 1640 Komplettmedium I. Hierfür wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in eine Gewebekulturflasche ( $83 \text{ cm}^2/260 \text{ ml}$ ) mit 40 ml Medium überführt. Die Zellkultur wurde für 5 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert bis der Boden der Gewebekulturflasche mit einem konfluenten Zellmonolayer bedeckt war. Für die Zellpassage wurden die adhärenten Zellen mit einem Zellschaber mechanisch vom Flaschenboden gelöst und anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 1600 rpm in der Minifuge T sedimentiert. Nach Resuspension der Zellen in Kultivierungmedium wurde die Zellzahl durch Eosinfärbung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und  $5 \times 10^6$  Zellen zur Passage in 40 ml frisches Medium eingesetzt.

15

20 c. Zellzahlbestimmungen

25 Bestimmung der Zellzahl durch Eosinfärbung in der Neubauer-Zählkammer (Lindl und Bauer, 1989, Zell- und Gewebekultur, S. 75-90, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York)

30 Zur Bestimmung der Zellzahl in Suspensions- und Monolayerkulturen wurde in PBS eine Zellkonzentration von  $0.1 - 1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und eine Portion dieser Zellsuspension mit 20  $\mu\text{l}$  Eosin versetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension vorsichtig mit einer Pipette durchmischt, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unmittelbar nach der Inkubationszeit im Umkehr-Phasenkontrast-Mikroskop, wobei die Zellen innerhalb der vier großen Quadrate gezählt wurden. Vitale Zellen wurden

hierbei im Gegensatz zu avitalen Zellen nicht angefärbt. Schwach angefärbte Zellen wurden als avital betrachtet.

5 Die Zahl vitaler Zellen/ml ergab sich aus der Anzahl nichtgefärbter Zellen der vier Großquadrate multipliziert mit dem Kammerfaktor  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension in der Eosinlösung.

Bestimmung der Zellzahl durch elektronische Zählung im Coulter-Counter (Lindl

und Bauer, 1989)

10 Die Messung der Zellzahl im Coulter-Counter beruht auf einem Durchfluß der Zellen zwischen zwei Platinelektroden. Passiert eine Zelle die Öffnung der beiden Elektroden, so ändert sich der Widerstand des durch die Elektroden fließenden Stroms proportional zur Größe der Zelle. Dies erzeugt einen Spannungsimpuls, der aufgezeichnet wird und somit eine Quantifizierung der Zellen erlaubt.

15 Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 25  $\mu$ l der Zellsuspension in 3 ml Iso-Osmol, einer Trägerflüssigkeit für den Coulter-Counter, überführt und in die Apparatur injiziert.

20 Bei dieser Art der Zellzählung wird die Gesamzellzahl der Zellsuspension bestimmt. Eine Unterscheidung vitaler und avitaler Zellen ist nicht möglich.

d. Ablösung adhärenter Zellen durch Trypsin/EDTA

25 Adhärente Zellen konnten auf enzymatischem Weg durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden des jeweiligen Kulturgefäßes gelöst werden. Hierfür wurde der Kulturüberstand vorsichtig dekantiert und die Zellen zweimal mit vorgewärmten (37 °C) Kultivierungsmedium gewaschen. Zur Ablösung der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes wurden diese für 5 min mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (1 x) bei Raumtemperatur inkubiert. Das Volumen an Trypsin/EDTA-Lösung wurde hierbei so gewählt, daß der Boden des jeweiligen Kulturgefäßes 2 - 3 mm mit der enzymatischen Lösung bedeckt war. Nach Beendigung der

5 Inkubationszeit wurden die Zellen durch vorsichtiges Schütteln der Flasche vom Boden gelöst, aus dem Kulturgefäß entfernt und mit einem gleichen Volumen an RPMI 1640 Komplettmedium I versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 1600 rpm in der Minifuge T sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in kaltem PBS resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann entsprechend ihrer weiteren Verwendung in Kultivierungsmedium oder Puffer resuspendiert.

10 e. Isolierung von mononuklearen Zellen aus Humanblut

15 Isolierung von humanen PBL aus "Buffy coat" durch Zentrifugation im isotonischen Dichtegradienten (Böyum, 1968, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97), 77-89; Böyum 1976, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5 (Suppl. 5), 5-15)

20 15 Zur Isolierung von humanen PBL wurde "Buffy coat" von gesunden Spendern gemischt und mit RPMI 1640 Komplettmedium II im Volumenverhältnis 1:2 verdünnt. In Polypropylenrörchen (50 ml) wurden 20 ml kaltes Lymphozytentrennmedium vorgelegt und vorsichtig mit 15 ml des verdünnten "Buffy coats" überschichtet. Die Fraktionierung erfolgte durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für 30 min und 1600 rpm (Beschleunigung 4/Bremse 4) in der Minifuge T. Die zwischen Probe und Trennmedium gut sichtbare Bande wurde mit Hilfe einer Combitip-Pipette gewonnen. Zur Entfernung des Trennmediums wurden die gesammelten Fraktionen bei Raumtemperatur für 10 min und 1600 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen entsprechend ihrer Verwendung dreimal mit RPMI 1640 Komplettmedium II oder kaltem PBS gewaschen.

25 Stimulation und Kultivierung von humanen PBL

30 Nach Isolierung von humanen PBL mittels Zentrifugation im isotonischen Dichtegradienten war es möglich, periphere Lymphozytenkulturen anzulegen. Normalerweise sterben Blutzellen in Kultur relativ schnell ab. Lymphozyten können allerdings über mehrere Generationen in Kultur gehalten werden. Um eine

Proliferation dieser Zellen zu erreichen, wurden sie mit dem Mitogen PHA-M, dem Lektinextrakt der roten Feuerbohne (*Phaseolus vulgaris*), stimuliert.

5 Zur Stimulation wurden die isolierten Zellen in Gewebekulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>/800 ml) in RPMI 1640 Komplettmedium II auf eine Zelldichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und für 72 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Um eine zu große Zelldichte zu vermeiden, wurde nach 24 h die Zellsuspension mit Kultivierungsmedium im Volumenverhältnis 1:1 verdünnt. Nach Beendigung der Stimulation 10 wurde das Mitogen PHA-M durch dreimaliges Waschen mit RPMI 1640 Komplettmedium II entfernt. Zur Zellexpansion wurden die stimulierten Lymphozyten in RPMI 1640 Komplettmedium IV auf eine Zelldichte von 5 - 7 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und für 24 h kultiviert.

Herstellung von leukozytenreichem Plasma aus Vollblut (Böyum, 1968)

15 Venöses Frischblut von gesunden Spendern wurde zur Verhinderung der Gerinnung im Volumenverhältnis 49:1 mit steriler 10 % (w/v) EDTA-Lösung versetzt. Um eine schnelle Vermischung dieser Komponenten zu erreichen, wurden dem Spender kleine Volumina von 8 - 9 ml Blut in Polystyrolrörchen (14 ml) entnommen. Zur Herstellung von leukozytenreichem Plasma wurde EDTA-Blut und Dextran 75 im Volumenverhältnis 10:1 gemischt. Die beiden Komponenten wurden gut durchmischt, und die Erythrozyten bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 60 min sedimentiert. Anschließend wurde der fast klare Überstand, das leukozytenreiche Plasma, mit einer Pipette vorsichtig entnommen und zur Isolierung von Monozyten 20 verwendet.

25

Isolierung von humanen Monozyten aus leukozyten-reichem Plasma durch Zentrifugation im hypertonischen Dichtegradienten (Böyum, 1983, Scan. J. Clin. Lab. Invest. 17, 429-436)

30 In einer hypertonischen Lösung war es möglich, nichtstimulierte Monozyten aus Vollblut oder leukozytenreichem Plasma zu isolieren. Hierfür wurden in Polystyrolrörchen (14 ml) 3 ml des hypertonischen Trennmediums NycoPrep 1.068

5 vorgelegt und vorsichtig mit 6 ml leukozytenreichem Plasma überschichtet. Die Röhrchen wurden verschlossen und in der Minifuge T bei Raumtemperatur für 15 min und 600 x g (Beschleunigung 4/Bremse 4) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die klare Plasmaphase bis 5 mm über der breiten, diffusen Bande entfernt und verworfen. Die verbleibende Plasmaphase und die Hälfte der breiten, diffusen Bande wurde entnommen und die Zellen durch Zentrifugation in der Minifuge T für 7 min unter gleichen Bedingungen sedimentiert. Das Zellsediment wurde anschließend zur Entfernung von Resten des Trennmediums zweimal in 6 ml Waschlösung resuspendiert und gewaschen.

10

	<u>Nycoprep 1.068</u>	13 % (w/v)	Nycodenz
		0.58 % (w/v)	NaCl
		5 (mM)	Tricine/NaOH pH 7.4
		Dichte	1.068 ± 0.001 g/ml (20 °C)
15		Osmolarität	335 ± 5 mOsm

	<u>Waschlösung</u>	0.9 % (w/v)	NaCl
		0.13 % (w/v)	EDTA
		1 % (w/v)	BSA (Fraktion V)

20

Isolierung von humanen Monozyten aus "Buffy coat" durch Adhärenz (Andreesen et al., 1983, J. Immun. Methods 56, 295-304)

25

Aus "Buffy coat" wurden mononukleare Zellen durch Zentrifugation im isotonischen Dichtegradienten isoliert und dreimal mit serumfreiem RPMI 1640 Medium gewaschen. Zur Isolierung der Monozyten wurden die Zellen in Gewebekulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>/800 ml) mit 20 ml RPMI 1640 Komplettmedium II auf eine Zelldichte von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und für 45 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nichtadhärente Zellen wurden nach Beendigung der Inkubation durch Dekantieren des Mediums entfernt. Die Zellschicht am Boden der Gewebekulturflasche wurde anschließend zur Entfernung von Resten an Suspensionszellen zweimal mit temperiertem (37 °C), serumfreiem RPMI 1640 Medium gewaschen. Die Zellschicht wurde mit 30 ml RPMI 1640 Komplettmedium

30

V versetzt und für weitere 24 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Ablösung der adhärenten Monozyten erfolgte durch eine Behandlung mit Trypsin/EDTA.

**Beispiel 12:**

5

**Immunologische Methoden**

a. **Durchflußzytofluometrische Analyse von Zellsubpopulationen aus Humanblut durch direkte und sequentielle Antikörperfärbung**

10

Für die durchflußzytofluometrische Analyse wurden die zu charakterisierenden Zellen in FACS-PBS auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Antikörperstammlösungen wurden mit FACS-PBS im Volumenverhältnis 1:50 verdünnt. Für die direkte und sequentielle Antikörperfärbung wurden 50  $\mu$ l der Zellsuspension ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit konischem Boden vorgelegt.

15

Antikörper für die durchflußzytofluometrische Analyse mononuklearer humaner Blutzellen

Antikörper	Spezifität	Fluoreszenzfarbstoff	Antikörperfärbung
<b>Anti-Leu-12 (CD19)</b>	<b>Leu-12 (CD19) B-Lymphozyten</b>	<b>PE</b>	<b>direkt</b>
<b>Anti-Leu-5b (CD2)</b>	<b>Leu-5 (CD2) T-Lymphozyten</b>	<b>FITC</b>	<b>direkt</b>
<b>Anti-Monozyt (CD14)</b>	<b>gp 55 Monozyten Makrophagen</b>	<b>-</b>	<b>sequentiell</b>
<b>Anti-Leu-2a (CD8)</b>	<b>Zytotoxische- T-Lymphozyten</b>	<b>FITC</b>	<b>direkt</b>
<b>Anti-Leu-3a (CD4)</b>	<b>Helfer- T-Lymphozyten</b>	<b>PE</b>	<b>direkt</b>

5 Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem gleichen Volumen des Antikörpers versetzt, der im Falle einer direkten Antikörperfärbung mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist. Die Ansätze wurden für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend zur Sedimentation der Zellen bei 1400 rpm und Raumtemperatur für 2 min in der Minifuge T zentrifugiert.

10

Die Überstände wurden entfernt, und das Zellsediment zur Entfernung von Resten des nichtgebundenen Antikörpers in 200 µl FACS-PBS resuspendiert und erneut, wie beschrieben, zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellsediment im Falle einer direkten Antikörperfärbung in 100 µl FACS-PBS resuspendiert.

15

Bei einer sequentiellen Antikörperfärbung wurde nach Beendigung der Zentrifugation das Zellsediment in 100 µl einer Lösung des mit Phycoerythrin markierten Antikörpers Ziege-Anti-Maus Ig-R-PE (3 µg/ml) aufgenommen und für

30 min bei 4 °C inkubiert. Reste des nichtgebundenen Antikörpers wurden, wie beschrieben, durch Waschen mit 200 µl FACS-PBS entfernt und das Zellsediment zur durchflußzytofluometrischen Zellanalyse in 100 µl FACS-PBS resuspendiert.

5 b. Bestimmung der Zellvitalität durch Propidiumjodidfärbung im durchflußzytofluometrischen Analysator

Die Bestimmung der Anzahl vitaler und avitaler Zellen durch durchflußzytofluometrische Analyse ist nach Färbung der Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff Propidiumjodid möglich. Dieser Farbstoff wird nur von avitalen Zellen aufgenommen. Hierfür wurde die Zellsuspension in PBS auf eine Konzentration von 0.5 - 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Aus dieser Zellsuspension wurden 180 µl entnommen und mit 20 µl einer Propidiumjodidlösung (5 µg/ml) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 100 µl der Lösung in den Zellanalysator injiziert. Durch eine statistische Analyse im Lysis II-Programm des Zellanalysators konnte die prozentuale Verteilung der vitalen und avitalen Zellen bestimmt werden.

20 c. Quantitative Bestimmung von AZT in Zellextrakten mittels <sup>125</sup>I-AZT-Radioimmuno-Assay

Zur quantitativen Bestimmung von AZT wurde ein kommerzieller <sup>125</sup>I-AZT RIA Test-Kit verwendet. Puffer und Lösungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers angesetzt und im Test-Kit eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden nach untenstehendem Schema (Tab.) pipettiert, vorsichtig gemischt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zur Präzipitation des Komplexes aus <sup>125</sup>I-AZT und des AZT-Antikörpers (aus Kaninchen) 500 µl des Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörpers hinzugefügt. Die Ansätze wurden gemischt und erneut bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert.

**Pipettierschema des  $^{125}\text{J}$ -AZT-Radioimmuno-Assays zur quantitativen Bestimmung von AZT in Zellextrakten**

	nicht bindender Standard	Nullstandard	Standard	Probe
<b>Nullstandard [µl]</b>	<b>300</b>	<b>200</b>	-	-
<b>Standard [µl]</b>	-	-	<b>200</b>	-
<b>Probe [µl]</b>	-	-	-	<b>200</b>
<b><math>^{125}\text{J}</math>-AZT [µl]</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>AZT-Antikörper [µl]</b>	-	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

5 Zur Sedimentation des Präzipitationskomplexes wurden die Ansätze anschließend bei 1000 x g für 20 min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde die Radioaktivität des Sedimentes für 60 sec im Flüssigkeits-Szintillations-Analysator gemessen. Zur Ermittlung des Absolutwertes wurde die Radioaktivität von 100 µl  $^{125}\text{J}$ -AZT nach einer Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur unter gleichen Bedingungen bestimmt. Die Konzentrationen an AZT in der biologischen Matrix wurde mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt, die mit Standards definierter Substanzkonzentrationen des Test-Kits erstellt wurde.

10

**Beispiel 13:****Charakterisierung der intrazellulären enzymatischen Spaltung von BM 21.1290 Na**

5 Die Ergebnisse der *In-vitro*-Pharmakokinetikstudien mit AZT-DMDOPE bzw. AZT in stimulierten und nichtstimulierten humanen PBL sowie thymidinkinasedefizienten P3X63Ag8.653-Zellen deuten auf eine intrazelluläre enzymatische Spaltung von AZT-DMDOPE unter direkter Freisetzung von AZT-MP und des korrespondierenden Thioetherlipidteiles DMDOP hin. Diese intrazelluläre enzymatische Spaltung sollte in

10 weiteren Experimenten auf subzellulärer Ebene durch einen direkten Nachweis der entsprechenden Metabolite belegt werden. Für eine eindeutige Charakterisierung der Spaltung war somit die Identifizierung der bisher bekannten Metabolite notwendig, die aus der Muttersubstanz AZT-DMDOPE entstehen können. Hierzu gehören die Substanzen DMDOP, AZT und AZT-MP, sowie die Substanzen, die durch Oxidation des Schwefels im

15 Thioetherlipidteil aus der Muttersubstanz AZT-DMDOPE entstehen.

a. Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der R<sub>f</sub>-Werte von AZT-DMDOPE und dessen potentieller Metabolite

20 Die Identifizierung der potentiellen Metabolite von AZT-DMDOPE war mit Hilfe der DC möglich. Hierfür wurden die nicht radioaktiv markierten Reinsubstanzen mit Hilfe verschiedener Trennsysteme analysiert und anschließend eine Bestimmung der R<sub>f</sub>-Werte durchgeführt.

25 Die Substanzen wurden hierfür in einem Gemisch aus Essigsäureethylester und Methanol (1:1, v/v) mit einer Konzentration von 4 mg/ml gelöst. Mit Hilfe einer Mikrokapillare wurden 5 µl dieser Lösungen auf die stationäre Phase aufgetragen und analysiert.

30 Thioetherlipide wie AZT-DMDOPE, DMDOP, sowie solche, die durch Oxidation des Schwefels entstehen, konnten mit Hilfe eines jodhaltigen Reagenz markiert werden, das den Thioetherlipidteil dieser Verbindungen anfärbt. AZT und AZT-MP konnten aufgrund ihrer Absorption im ultravioletten Bereich bei 254 nm

ausschließlich auf DC-Platten mit Fluoreszenzindikator sichtbar gemacht werden. AZT-DMDOPE, die Substanz mit Thioetherlipidteil und chromophorer Gruppe, waren beiden Arten der Detektion zugänglich.

5 Für die dünnenschichtchromatographische Analyse der Substanzen wurden drei Trennsysteme etabliert, die sich hinsichtlich ihrer stationären und mobilen Phasen unterscheiden.

10 Im ersten Trennsystem, dem IBA-System, mit Kieselgel 60 als stationärer Phase, konnte die Muttersubstanz AZT-DMDOPE neben DMDOP identifiziert werden. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus 2-Propanol:n-Butylacetat:Aqua bidest. (10:6:4, v/v/v) eingesetzt.

15 Eine Weiterentwicklung dieses Trennsystems wurde durch die Verwendung von 2-Propanol:n-Butylacetat:Aqua bidest.:Eisessig (3:5:1:1, v/v/v/v) als mobile Phase (IBAE-System) erreicht. Die Substanzen AZT-DMDOPE und DMDOP konnten hierbei, wie im IBA-Trennsystem beschrieben, auf Kieselgel 60 DC-Platten getrennt werden. Zusätzlich konnten AZT und AZT-MP im UV-Licht bei 254 nm und Verwendung einer stationären Phase aus Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator getrennt werden. Aufgrund des AZT-Teils war ebenfalls eine Detektion der Muttersubstanz AZT-DMDOPE sowie deren Oxidationsprodukte möglich.

20 Nach Visualisierung der Substanzen auf der DC-Platte wurden die  $R_f$ -Werte bestimmt.

25 Zur Unterscheidung der Substanz AZT-DMDOPE von DMDOP stand ein weiteres Trennsystem zur Verfügung. Hierbei wurde als mobile Phase ein Gemisch aus n-Heptan und Essigsäureethylester (4:1, v/v) und als stationäre Phase Kieselgel 60 verwendet. Die Detektion wurde mit dem bereits beschriebenen jodhaltigen Reagenz durch Anfärben des Thioetherlipidteils der Substanzen durchgeführt.

30 Im Vergleich zum IBA- und IBAE-System konnte für die Substanz DMDOP mit diesem Trennsystem ein deutlich niedriger  $R_f$ -Wert bestimmt werden. Grund hierfür

ist eine im Vergleich zum IBA- und IBAE-System unpolare mobile Phase, bestehend aus n-Heptan und Essigsäureethylester. Die Nachweisgrenze der Substanzen nach dünnsschichtchromatographischer Analyse und Detektion mit einem jodhaltigen Reagenz wurde in allen Trennsystemen mit 0.1 µg/ml bestimmt.

5

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß mit Hilfe der beschriebenen dünnsschichtchromatographischen Trennsysteme alle Substanzen, die nach derzeitigem Kenntnisstand als potentielle Metabolite von AZT-DMDOPE in Frage kommen, sich über ihre  $R_f$ -Werte eindeutig charakterisieren lassen.

10

**Tab.**  *$R_f$ -Werte von AZT-DMDOPE und DMDOP nach Trennung im IBA-System (2-Propanol:n-Butylacetat:Aqua bidest, 10:6:4, v/v/v) und Kieselgel 60 als stationärer Phase (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 6 Bestimmungen)*

15

Testsubstanz	$R_f$ -Wert
AZT-DMDOPE	$0.68 \pm 5.2 \times 10^{-3}$
DMDOP	$0.93 \pm 0.00$

20

**Tab.**  *$R_f$ -Werte von AZT-DMDOPE, DMDOP, AZT und AZT-MP nach Trennung im IBAE System (2-Propanol:n-Butylacetat:Aqua bidest:Eisessig, 3:5:1:1, v/v/v/v) und Kieselgel 60 bzw. 60 F 254 als stationärer Phase (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 6 Bestimmungen)*

Testsubstanz	$R_f$ -Wert
AZT-DMDOPE	$0.57 \pm 1 \times 10^{-2}$
DMDOP	$0.99 \pm 0.00$
AZT	$0.85 \pm 0.00$
AZT-MP	$0.14 \pm 0.00$

b. Enzymatische Spaltung von AZT-DMDOPE durch Zellhomogenate von stimulierten und nichtstimulierten humanen PBL sowie von CEM-SS-Zellen

5 Die Spaltung von AZT-DMDOPE wurde mit Hilfe eines Enzym-Assays mit [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE und AZT-DMDOPE als Substrat untersucht. Als Enzymquelle wurden zunächst Zellhomogenate von CEM-SS-Zellen und humanen PBL verwendet.

10 **Tab. R<sub>f</sub>-Werte von AZT-DMDOPE und DMDOP nach dünnenschichtchromatographischer Trennung im HE-System (n-Heptan:Essigsäureethylester, 4:1, v/v) und Kieselgel 60 als stationärer Phase (Mittelwerte ± SD, n = 6 Bestimmungen)**

Testsubstanz	R <sub>f</sub> -Wert
AZT-DMDOPE	0.0 ± 0.00
DMDOP	0.36 ± 0.00

15 Letztere wurden sowohl nach Stimulation mit PHA-M als auch in nichtstimuliertem Zustand direkt nach ihrer Isolierung homogenisiert und im Enzym-Assay eingesetzt.

20 Zur Herstellung der Zellhomogenate wurden Zellsuspensionen mit einer Dichte von 5 x10<sup>7</sup> Zellen/ml 50 mM Tris (pH 7.4) im Glashomogenisator mechanisch aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wurde hierbei im Umkehr- Phasenkontrast-Mikroskop optisch kontrolliert.

5

**Tab. *R<sub>f</sub>-Werte der Substanzen 1 - 4 (Abb. 18) nach 1, 3, 6 und 24 h Inkubation und enzymatischer Spaltung von [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE durch Zellhomogenate von 5 x 10<sup>7</sup> stimulierten und nicht- stimulierten humanen PBL und CEM-SS-Zellen. Trennung im IBA/IBAE-System mit Kieselgel 60 als stationärer Phase (Mittelwerte ± SD, n = 4 Bestimmungen)***

	R <sub>f</sub> -Wert Substanz 1	R <sub>f</sub> -Wert Substanz 2	R <sub>f</sub> -Wert Substanz 3	R <sub>f</sub> -Wert Substanz 4
<b>CEM-SS</b>	<b>0.41</b> <b>± 2.5 x 10<sup>-2</sup></b>	<b>0.56</b> <b>± 2.5 x 10<sup>-2</sup></b>	<b>0.86</b> <b>± 5.8 x 10<sup>-3</sup></b>	<b>0.96 ± 0.0</b>
<b>stimulierte humane PBL</b>	<b>-</b>	<b>0.65</b> <b>± 9.5 x 10<sup>-3</sup></b>	<b>0.86</b> <b>± 5.8 x 10<sup>-3</sup></b>	<b>0.94 ± 0.0</b>
<b>nichtstimulierte humane PBL</b>	<b>-</b>	<b>0.65</b> <b>± 1.7 x 10<sup>-2</sup></b>	<b>-</b>	<b>0.92</b> <b>± 1.2 x 10<sup>-2</sup></b>

10

Zunächst wurde 1 ml dieses Zellhomogenates in dem Enzym-Assay ohne vorherige Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt. Als Substrat wurden 0.98 nmol [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE (1.67 kBq) eingesetzt.

15

Zur Gewährleistung einer Substratsättigung wurden weitere 50 nmol der nichtradioaktiv markierten Verbindung hinzugefügt. [<sup>14</sup>C]-AZT-DMDOPE trägt die radioaktive Markierung im Thioetherlipidteil und erlaubt somit eine eindeutige Identifikation der potentiellen Metabolits [<sup>14</sup>-C]DMDOPE.

20

Die Ansätze wurden für 1, 3, 6 und 24 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Als Vergleich wurde ein Ansatz ohne Zugabe von Zellhomogenat mitgeführt. Anschließend wurden die Spaltprodukte mit Diethylether:2-Propanol (9:1, v/v) extrahiert und dünnenschichtchromatographisch im IBA- und IBAE-System analysiert (Abb. 18). Nach Trennung der Substanzen wurde zur Detektion der radioaktiv markierten Substanzen die DC-Platte 15 min im Radio-DC-Analysator gemessen.

Eine eindeutige Identifizierung der Metaboliten war schließlich durch Bestimmung der  $R_f$ -Werte möglich.

5

***Tab.  $R_f$ -Werte der Substanzen 1 und 2 (Abb. 18) nach 1, 3, 6 und 24 h Inkubation von  $[^{14}\text{C}]$ -BM 21.1290 Na. Trennung im IBA/IBAE- System mit Kieselgel 60 als stationärer Phase (Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 4 Bestimmungen)***

	$R_f$ -Wert Substanz 1	$R_f$ -Wert Substanz 2
<b>CEM-SS</b>	<b><math>0.41 \pm 5.7 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>0.56 \pm 5.8 \times 10^{-3}</math></b>
<b>stimulierte humane PBL</b>	-	<b><math>0.65 \pm 9.6 \times 10^{-3}</math></b>
<b>nichtstimulierte humane PBL</b>	-	<b><math>0.65 \pm 1.9 \times 10^{-2}</math></b>

10

Die dünnenschichtchromatographische Analyse der enzymatischen Spaltprodukte von AZT-DMDOPC durch Zellhomogenate stimulierter und nichtstimulierter humarer PBL wurde durch Anwendung des IBA-Trennsystems durchgeführt. In den sich anschließenden Experimenten mit CEM-SS-Zellhomogenat wurde die Analyse der Spaltprodukte im IBAE-Trennsystem durchgeführt. Da von beiden Trennsystemen die  $R_f$ -Werte der Reinsubstanzen ermittelt wurden, war ein direkter Vergleich der Ergebnisse zur Identifikation der Substanzen nach enzymatischer Spaltung von AZT-DMDOPC möglich.

15

20

Nach enzymatischer Spaltung von  $[^{14}\text{C}]$ -AZT-DMDOPC durch Zellhomogenate stimulierter bzw. nichtstimulierter humarer PBL wurden drei unbekannte Substanzen im DC-Chromatogramm detektiert. Mit  $R_f$ -Werten von  $0.65 \pm 9.5 \times 10^{-2}$  ( $n = 4$ ) und  $0.65 \pm 1.7 \times 10^{-2}$  ( $n = 4$ ) für stimulierte und nichtstimulierte humare PBL konnte Substanzpeak 2 eindeutig der Muttersubstanz  $[^{14}\text{C}]$ -AZT-DMDOPC zugeordnet

werden. Die  $R_f$ -Werte von Substanzpeak 4 mit  $0.94 \pm 0.00$  ( $n = 4$ ) und  $0.92 \pm 1.2 \times 10^{-2}$  ( $n = 4$ ) waren identisch mit den Werten von DMDOP, die durch DC-Analyse der Reinsubstanzen bestimmt wurden. Substanzpeak 3 mit einem  $R_f$ -Wert von  $0.86 \pm 5.8 \times 10^{-3}$  ( $n = 4$ ) konnte keiner der bekannten Substanzen zugeordnet werden. Die Ergebnisse wurden durch Analyse der enzymatischen Spaltung von [ $^{14}\text{C}$ ]-AZT-DMDOPE durch CEM-SS-Zellhomogenate bestätigt. Substanzpeak 2 und 4 mit  $R_f$ -Werten von  $0.56 \pm 2.5 \times 10^{-2}$  ( $n = 4$ ) und  $0.96 \pm 0.00$  ( $n = 4$ ) konnten eindeutig als AZT-DMDOPE bzw. DMDOP identifiziert werden, während Substanzpeak 1 mit einem  $R_f$ -Wert von  $0.41 \pm 2.5 \times 10^{-2}$  ( $n = 4$ ) einem Oxidationsprodukt zugeordnet werden konnte. Für Substanzpeak 3 konnte auch im IBAE-System nach Vergleich der  $R_f$ -Werte keine Zuordnung getroffen werden (Abb. 18). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß nach Inkubation von [ $^{14}\text{C}$ ]-AZT-DMDOPE ohne Zugabe von Zellhomogenat nur die Muttersubstanz zu detektieren war (Abb. 18).

Aus der dünnenschichtchromatographischen Analyse der Reaktionsansätze konnte somit der Beweis geführt werden, daß die Substanz DMDOP aus der Muttersubstanz freigesetzt wird.

**Beispiel 14:**

9-( $\beta$ -D-Arabinofuranosyl)-2-fluoradenin-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester (Fludarabin-Konjugat)

34.8 g (0.07 mol) Phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester wurden in 130 ml abs. Pyridin gelöst, unter Stickstoff mit 15 g Methansulfonsäurechlorid versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Dann wurden 20 g Fludarabin vorsichtig eingetragen und die Lösung weitere 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Fludarabin wurde analog zu J.Heterocyclic Chem. 16, 157 (1979) hergestellt.

Nach Hydrolyse des Reaktionsgemisches durch Zugabe von 30 ml 1M Triethylammoniumbicarbonat-Lösung und einstündiges Rühren wurde das Pyridin im Vakuum entfernt, der Rückstand zwischen 200 ml t-Butylmethylether (MTB) und 150 ml Wasser verteilt, die organische Phase abgetrennt und im Rotationsverdampfer eingedampft.

Der Rückstand wurde chromatographisch an RP-18 mit Methanol/0.02M Acetatpuffer pH 4 8/2 als Eluens gereinigt.

Die produktenthaltenden Fraktionen wurden bis auf den Wasseranteil eingeengt, mit MTB extrahiert und die MTB-Phase mit Natriummethylat-Lösung gegen Friscolyt auf pH 7 eingestellt.

Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Aceton suspendiert, der amorphe Niederschlag abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 23.7 g (43 %). Amorph. Rf = 0.45 (DC-Laufmittel: Isopropanol/Butylacetat/Wasser/Ammoniak 50/30/15/5).

10

**Beispiel 15:**

2-Chlor-2'-desoxyadenosin-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester (Cladribin-Konjugat)

15

Cladribin-Konjugat wurde analog zu Beispiel 14 unter Verwendung von 4.2 g Phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester, 3 g Methansulfonsäure, 100 ml Pyridin und 2 g Cladribin mit 35 % Ausbeute hergestellt. Rf = 0.41 (Laufmittel wie in Bsp. 14). Cladribin wurde analog zu J.Am.Chem.Soc. 106, 6379 (1984) hergestellt.

20

**Beispiel 16:**

[3-(2-Desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-3,6,7,8-tetrahydroimidazo[4,5-d][1,3]diazepin-8-ol]-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester (Pentostatin-Konjugat)

Pentostatin-Konjugat wurde analog zu Beispiel 14 unter Verwendung von 4.2 g Phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester, 3 g Methansulfonsäure, 100 ml Pyridin und 2.1 g Pentostatin mit 27 % Ausbeute hergestellt. Rf = 0.52 (Laufmittel wie in Bsp. 14). Pentostatin wurde analog zu J.Org.Chem. 47, 3457 (1982) bzw. J.Am.Chem.Soc. 101, 6127 (1979) hergestellt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Lipid-Cleavage-Enzymkomplex (LCE) frei von Phospholipase C-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß es das Konjugat AZT-DMDOPE [(3'-Desoxy-3'-azidothymidin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester] in AZT-MP [3'-Desoxy-3'-azidothymidinmonophosphat] und DMDOP [(3-Dodecylmercapto-2-decyloxy)-propanol] spaltet oder das Konjugat FLT-DMDOPE [(3'-Desoxy-3'-fluorothymidin)-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester] in FLT-MP [3'-Desoxy-3'-fluorothymidin)-5'-monophosphat] und DMDOP spaltet oder das Konjugat 5-FU-DMDOPE [5-Fluoruridin-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxy)-propylester in 5-FU-MP [5-Fluoruridinmonophosphat] und DMDOP spaltet.  
5
- 15 2. LCE nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es aus Leukozyten, Monozyten, Tumorzellen, Nierenzellen, Lymphozyten, Zellen des Immuno/lymphatischen Systems oder Makrophagen erhältlich ist.
- 20 3. Isolierte subzelluläre Systeme zur Durchführung von In-vitro-Untersuchungsverfahren, dadurch gekennzeichnet, daß die subzellulären Systeme mit dem Enzym nach einem der Ansprüche 1 oder 2 angereichert sind.
- 25 4. Verwendung des Enzyms nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zum Auffinden oder zur Identifizierung von Substraten, Liganden, Inhibitoren oder Aktivatoren des LCE in einem geeigneten In-vitro-Untersuchungssystem.
5. Verwendung von subzellulären Systemen nach Anspruch 3 zum Auffinden oder zur Identifizierung von Substraten, Liganden, Inhibitoren oder Aktivatoren des LCE in einem geeigneten In-vitro-Untersuchungssystem.

6. Verfahren zum Auffinden von Verbindungen, die als Substrat, Ligand, Inhibitoren oder Aktivatoren des LCE's nach einem der Ansprüche 1 oder 2 fungieren, dadurch gekennzeichnet, daß in einem geeigneten Untersuchungssystem die Spaltprodukte nachgewiesen werden.  
5
7. Verfahren zum Auffinden von LCE-Analoga, in dem nach Anspruch 6 beschriebenen Verfahren aufgefundene Verbindungen in einem Screening-System verwendet werden.  
10
8. LCE-Analoga, erhältlich nach einem Verfahren nach Anspruch 7.  
10
9. LCE oder LCE-Analoga nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8, wobei das Enzym bei Konjugaten vom Typ L-B-D, in denen L ein lipidähnlicher Rest, B eine Phosphatbrücke oder eine Thiophosphatbrücke und D eine pharmakologisch aktive Substanz bedeutet oder B-D ein Wirkstoff Phosphonat darstellt, eine Spaltung der kovalenten Bindung zwischen dem Lipidteil L und dem Rest -B-D induziert.  
15
10. LCE oder LCE-Analoga nach einem der Ansprüche 1, 2, 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität des Enzyms bei der Spaltung des Konjugates in aktivierten Immunzellen, humanen Leukozyten, Monozyten, Tumorzellen, Lymphozyten, Nierenzellen, Zellen Immuno/lymphatischen Systems oder Makrophagen mindestens um den Faktor 2 höher ist im Vergleich zu nicht aktivierten Zellen.  
20
11. LCE oder LCE-Analoga nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 - 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität des Enzyms durch  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  inhibiert wird.  
25
12. Verwendung eines kovalenten Konjugates eines Lipid-Derivates und einer pharmakologisch aktiven Substanz zur Herstellung eines Arzneimittels zur gezielten Freisetzung des Restes -B-D in geeigneten Zielzellen, wobei der Lipidteil des kovalenten Konjugates ein Targeting des Konjugates zu den Zielzellen, Geweben oder Organen und einen Transport des Konjugates oder des Restes -B-D durch die Zellmembran dieser Zielzellen hindurch bewirkt, die Spaltung des Konjugates durch ein  
30

membranständiges Enzym nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 9 - 11 erfolgt, so daß eine spezifische Anreicherung des Restes -B-D oder D intrazellulär resultiert.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Spaltung des kovalenten Konjugates im wesentlichen an oder in der Membran oder in den betreffenden Zielzellen erfolgt.  
5
14. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Arzneimittel die Nebenwirkungen im Vergleich zur Verabreichung der freien, nicht an ein Lipid gebundenen Rest -B-D oder D vermindert.  
10
15. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, wobei das Konjugat im wesentlichen nicht im Plasma oder in der Leber gespalten wird.  
15
16. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Zielzellen humane Leukozyten, Monozyten, Makrophagen, immunologische Zellen, Tumorzellen oder Zellen des lymphatischen Systems, von Niere, Milz oder Gehirn sind.  
20
17. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 - 16, wobei das Arzneimittel geeignet ist, die intrazelluläre Konzentration des Restes -B-D oder D in den Zielzellen um mindestens 10% im Vergleich zur Verabreichung der freien, nicht an ein Lipid Reste-gebundenes -B-D oder D zu erhöhen.  
25
18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei die Konzentration der aktiven Substanz in den Zielzellen um mindestens 50% erhöht wird.  
30
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 - 18, wobei das Arzneimittel in einer Dosierungseinheit verabreicht wird, die einen niedrigeren äquivalenten Gehalt der konjugierten Substanz -B-D oder D im Vergleich zu der freien nicht-konjugierten Substanz enthaltenden Darreichungsform aufweist.  
20
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei der äquivalente Gehalt der konjugierten Substanz -B-D oder D weniger als 50 % im Vergleich zu der freien nicht-konjugierten Substanz enthaltenden Darreichungsform beträgt.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 - 19 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Verminderung von Organotoxizitäten von pharmakologisch aktiven Substanzen.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 - 20 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Verminderung der Knochenmarktoxizität von pharmakologisch aktiven Substanzen.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 - 20 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Verminderung der Cardiotoxizität, Nephrotoxizität, Hämatotoxizität, Hepatotoxizität oder Neurotoxizität von pharmakologisch aktiven Substanzen.

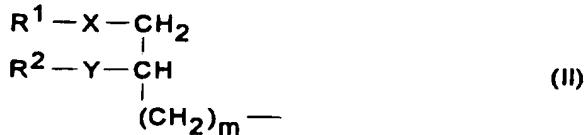
24. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 - 20 zur Herstellung von Arzneimitteln zum gezielten Transport von pharmakologisch aktiven Substanzen über die Blut-Hirn-Schranke.

25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei die pharmakologisch aktive Substanz in Zellen des Gehirns angereichert wird.

26. Verwendung nach Anspruch 24 oder 25, wobei es sich bei der pharmakologisch aktiven Substanz um ein oral applizierbares Therapeutikum handelt.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 - 26, wobei das Konjugat ein Wirkstoff der Formel L-B-D ist und L den Lipidteil, B ein Valenzstrich, eine Phosphatbrücke oder eine Thiophosphatbrücke und D eine pharmakologisch aktive Substanz darstellt bzw. B-D ein Wirkstoffphosphonat ist.

28. Verwendung eines kovalenten Konjugates L-B-D nach Anspruch 27, wobei L einen Rest der Formel II



30

**darstellt, wobei**

5                    R<sup>1</sup> eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylkette mit 1-30 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch Halogen, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-Cycloalkyl, Phenyl, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercapto-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy carbonyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylsulfinyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylsulfonylgruppen substituiert sein kann,

10                  R<sup>2</sup> Wasserstoff, eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylkette mit 1-20 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch Halogen, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-Cycloalkyl, Phenyl, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercapto-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy carbonyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylsulfonylgruppen substituiert sein kann,

15                  X einen Valenzstrich, Sauerstoff, Schwefel, Aminocarbonyl, Oxycarbonyl, Carboxyamino, Carbonyloxy, die Sulfinyl- oder die Sulfonylgruppe darstellt,

20                  Y ein Valenzstrich, Aminocarbonyl, Oxycarbonyl, Carbonylamino, Carbonyloxy, ein Sauerstoff- oder Schwefelatom ist, und

25                  m eine Zahl zwischen 1 und 5 darstellt.

29. Verwendung eines kovalenten Konjugates L-B-D nach Anspruch 28, wobei R<sup>1</sup> eine geradkettige oder verzweigte C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-Alkylgruppe, die durch eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy- oder eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercapto gruppe substituiert sein kann, bedeutet, und insbesondere eine Nonyl-, Decyl-, Undecyl-, Dodecyl-, Tridecyl- oder Tetradecylgruppe darstellt.

30. Verwendung eines kovalenten Konjugates L-B-D nach einem der Ansprüche 28 oder 29, wobei R<sup>2</sup> eine geradkettige oder verzweigte C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-Alkylgruppe, die durch eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxygruppe oder eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercapto gruppe substituiert sein kann, bedeutet, und insbesondere eine Octyl-, Nonyl-, Decyl-, Undecyl-, Dodecyl-, Tridecyl- oder Tetradecylgruppe darstellt.

31. Verwendung eines kovalenten Konjugates L-B-D nach einem der Ansprüche 27 - 30, wobei X ist ein Schwefelatom, eine Sulfinyl- oder Sulfonylgruppe bedeutet.
- 5 32. Verwendung eines kovalenten Konjugates L-B-D nach einem der Ansprüche 27 - 31, wobei Y ein Sauerstoffatom bedeutet.
33. Verwendung eines kovalenten Konjugates L-B-D nach einem der Ansprüche 27 - 32, wobei m die Zahlen 1 oder 2 bedeuten.
- 10 34. Verwendung eines kovalenten Konjugates L-B-D nach einem der Ansprüche 27 - 32, wobei m gleich 1, und X gleich S, Y gleich O, R<sup>1</sup> gleich einen Dodecylrest und R<sup>2</sup> einem Decylrest entspricht.
- 15 35. Verwendung eines kovalenten Konjugates L-B-D nach Anspruch 27, wobei X und Y einen Valenzstrich darstellen, R<sup>2</sup> gleich Wasserstoff ist und R<sup>1</sup> eine C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>-Alkylkette darstellt, die gegebenenfalls durch C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy, oder C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylmercapto substituiert sein kann.
- 20 36. Verwendung eines kovalenten Konjugates L-B-D nach einem der Ansprüche 27 - 35, wobei B eine Phosphatbrücke der Formel III



25 darstellt, in der n die Zahlen 1, 2 oder 3 und Z gleich O oder S ist, A entweder O, S oder einen Valenzstrich bedeutet.

37. Verwendung eines kovalenten Konjugates L-B-D nach einem der Ansprüche 27 - 36, wobei D oder B-D eine pharmakologisch aktive Substanz darstellt, ausgewählt aus der Gruppe der antiviralen, antiretroviralen, cytotoxischen, cytostatischen, 30 antitumoralen, immunsupprimierenden oder immunstimulierenden Substanzen.

38. Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur gezielten Freisetzung von Substanzen -B-D oder D in Zielzellen, wobei diese Zielzellen das Lipid-Cleavage-Enzym oder LCE-Analoga nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 - 11 enthalten, umfassend die Schritte

5

- a) Auswählen einer pharmakologisch aktiven Substanz,
- b) Herstellen eines kovalenten Konjugats aus der pharmakologisch aktiven Substanz und einem lipidartigen Trägermolekül,
- c) und Herstellen einer pharmazeutischen Darreichungsform, die als Wirkstoff das nach b) hergestellte Konjugat, sowie weitere pharmazeutische Hilfs- oder Trägerstoffe enthält.

10

15 39. Lipidkonjugate der Formel I vom Typ L-B-D (I), ausgewählt aus der Gruppe der folgenden Substanzen:

2-Fluor-9-(b-D-arabinofuranosyl)adenin-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxypropyl)ester,

20

2-Chlor-2'-desoxyadenosin-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxypropyl)ester,

3-(2-Desoxy-b-D-erythropentofuranosyl)-3,6,7,8-tetrahydro-imidazo-[4,5-d][1,3]-diazepin-8-ol-5'-phosphorsäure-(3-dodecylmercapto-2-decyloxypropyl)ester.

25

40. Diagnostisches Mittel enthaltend LCE oder LCE-Analoga nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 - 11 zur Durchführung von Bestimmungsverfahren für Substrate, Liganden, Aktivatoren oder Inhibitoren des lipidspaltenden Enzyms.

30

41. Mittel zum Auffinden von Substanzen, die als Substrate oder Liganden des Enzyms fungieren, enthaltend eine ausreichende Menge des isolierten oder in Zellpräparaten angereicherten LCE oder LCE-Analoga nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 - 11, sowie geeignete Stabilisierungsmittel.

42. Diagnostisches Mittel enthaltend eine Verbindung nach Anspruch 27 zur Bestimmung von pathologischen Veränderungen aufgrund erhöhter oder reduzierter Enzym-Aktivität oder Enzymaffinität, die mit entsprechenden Erkrankungen oder Krankheitssymptomen einhergehen.

1 / 1 8

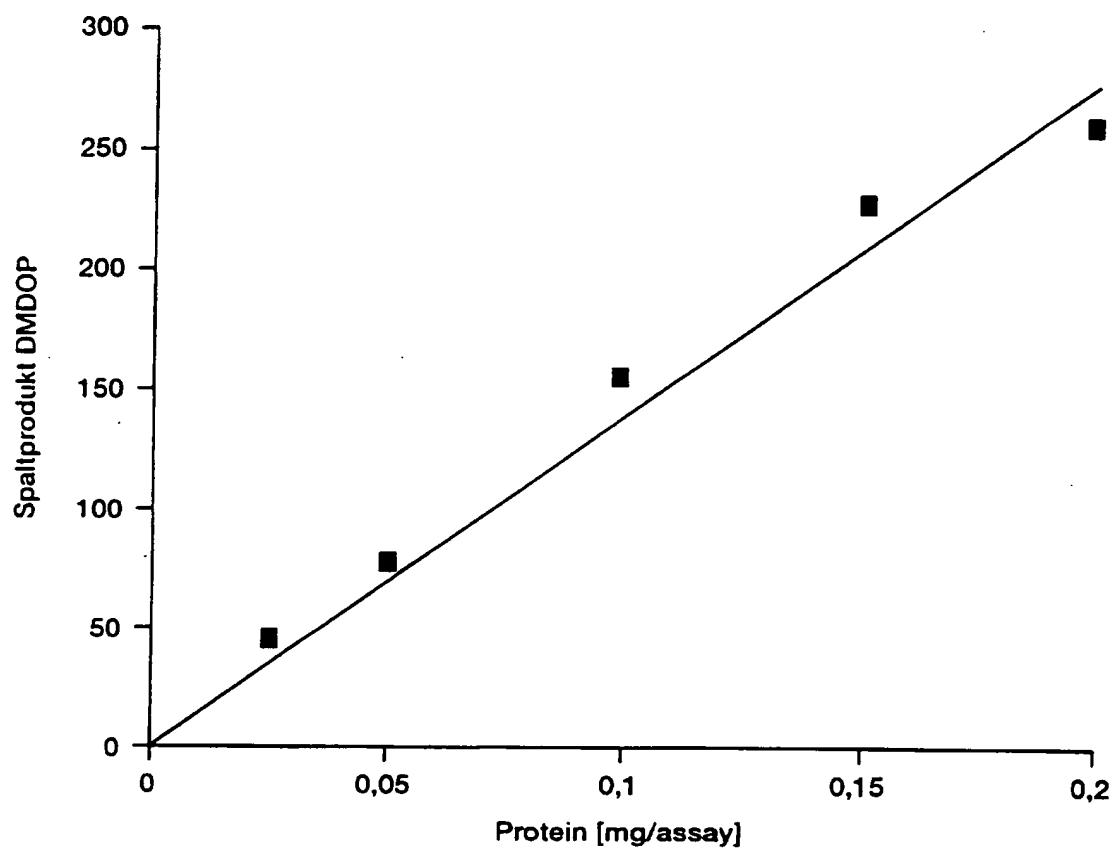


Abb. 1

2 / 18

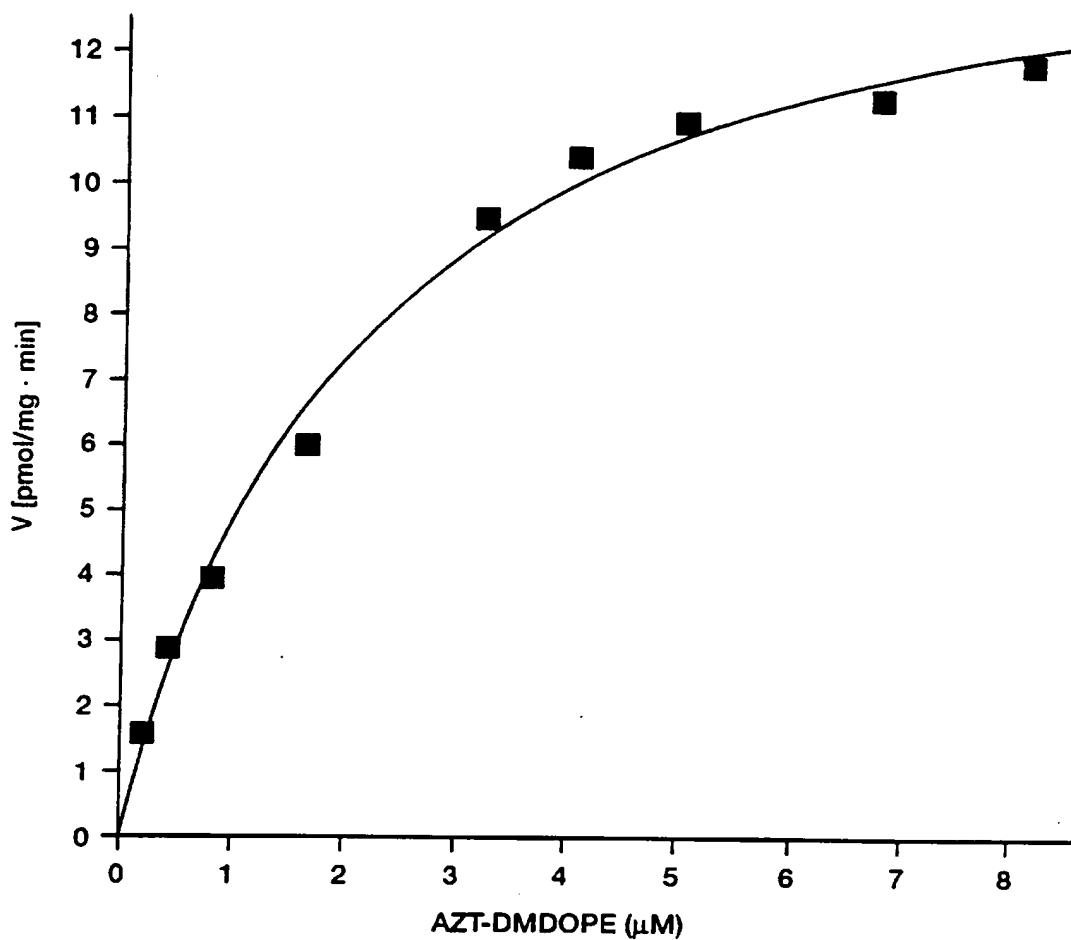


Abb. 2

3 / 18

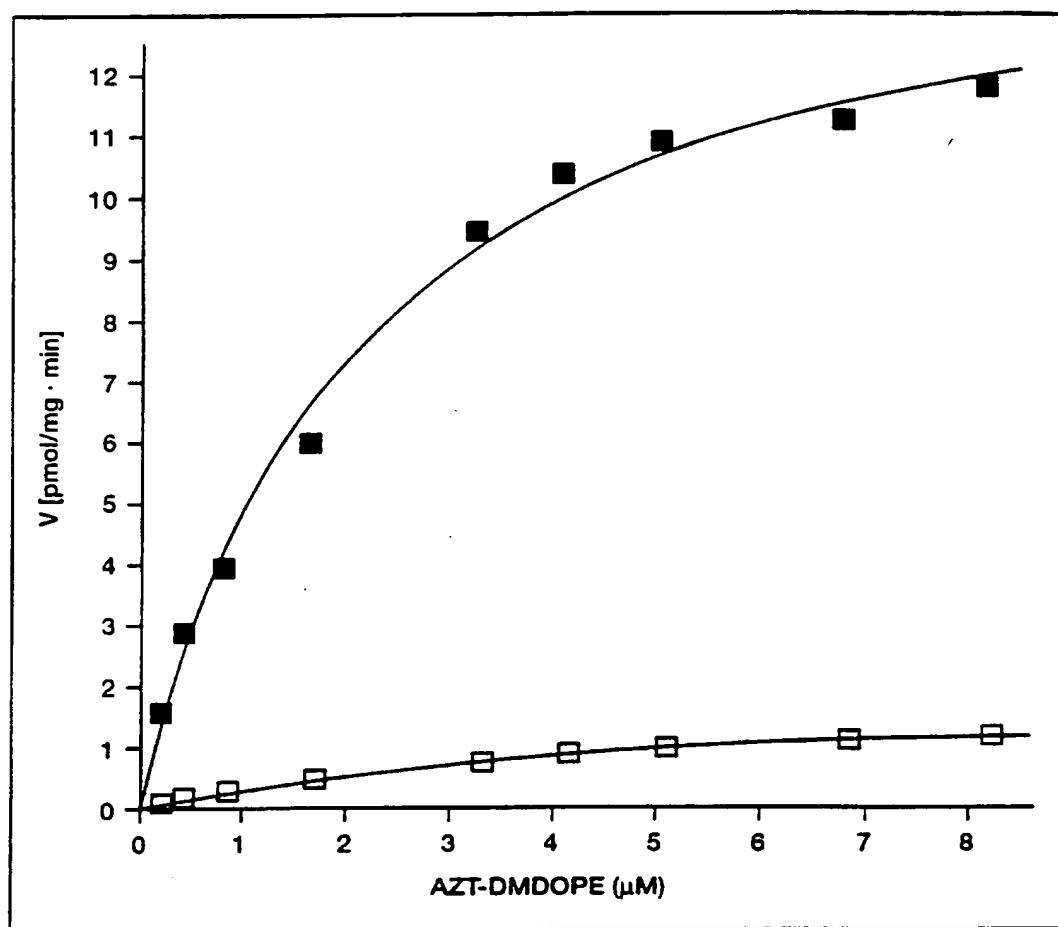


Abb. 3

4 / 1 8

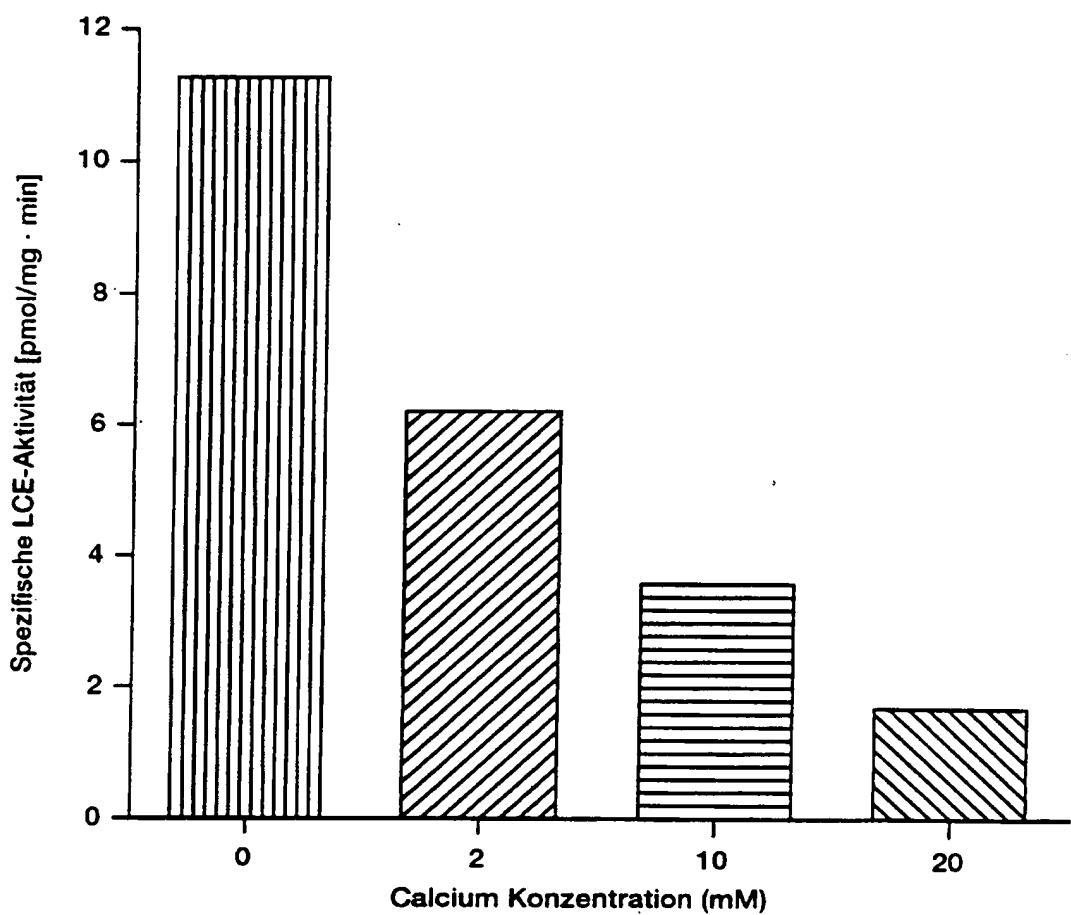
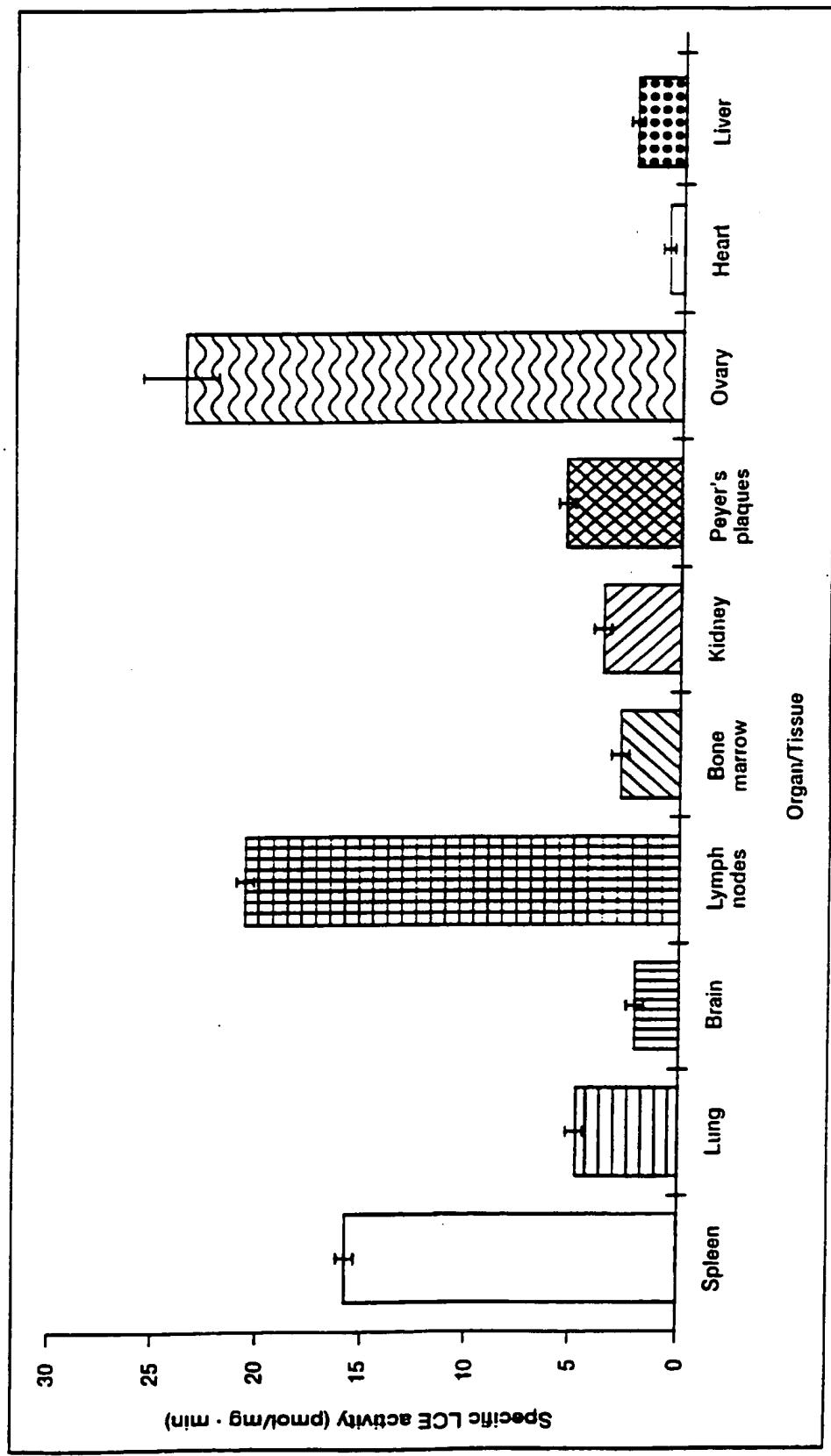


Abb. 4

Abb. 5



6 / 18

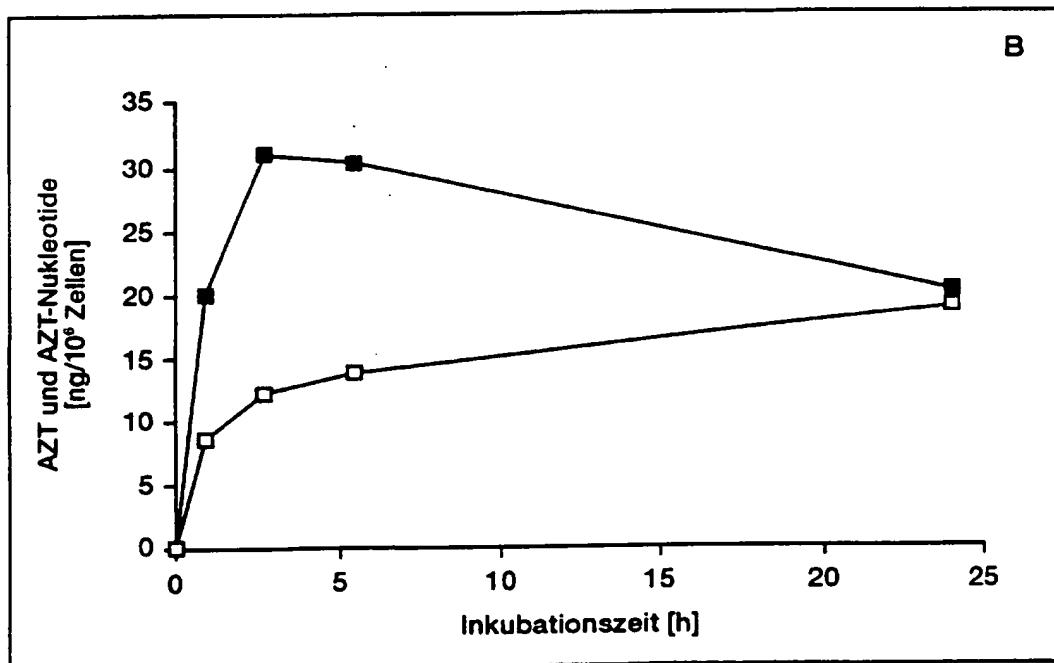
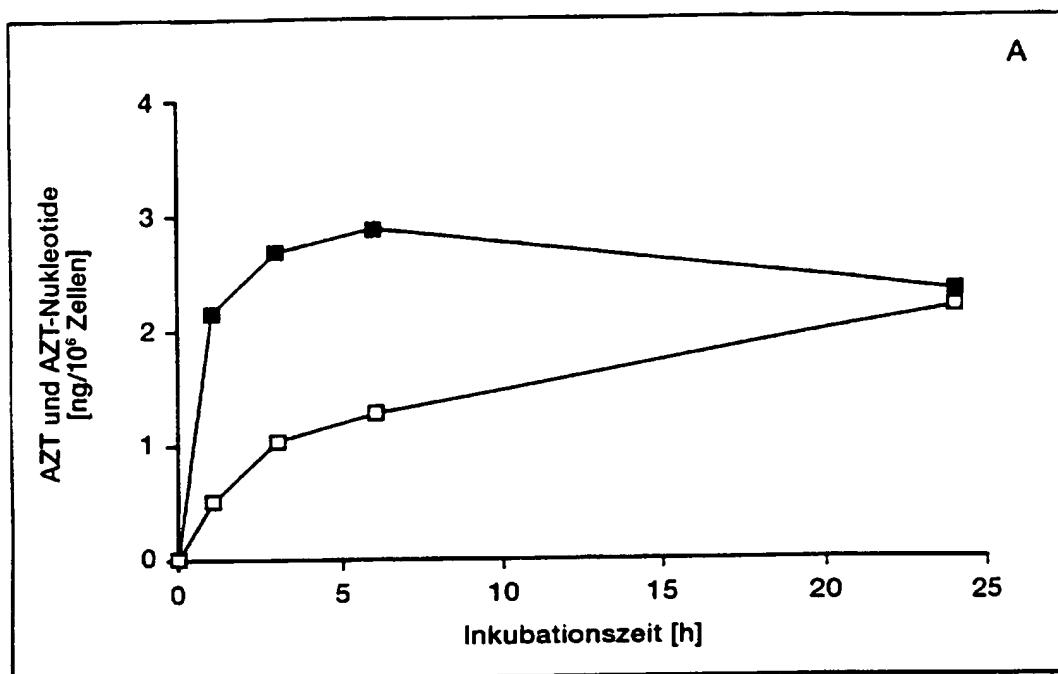


Abb. 6

7 / 18

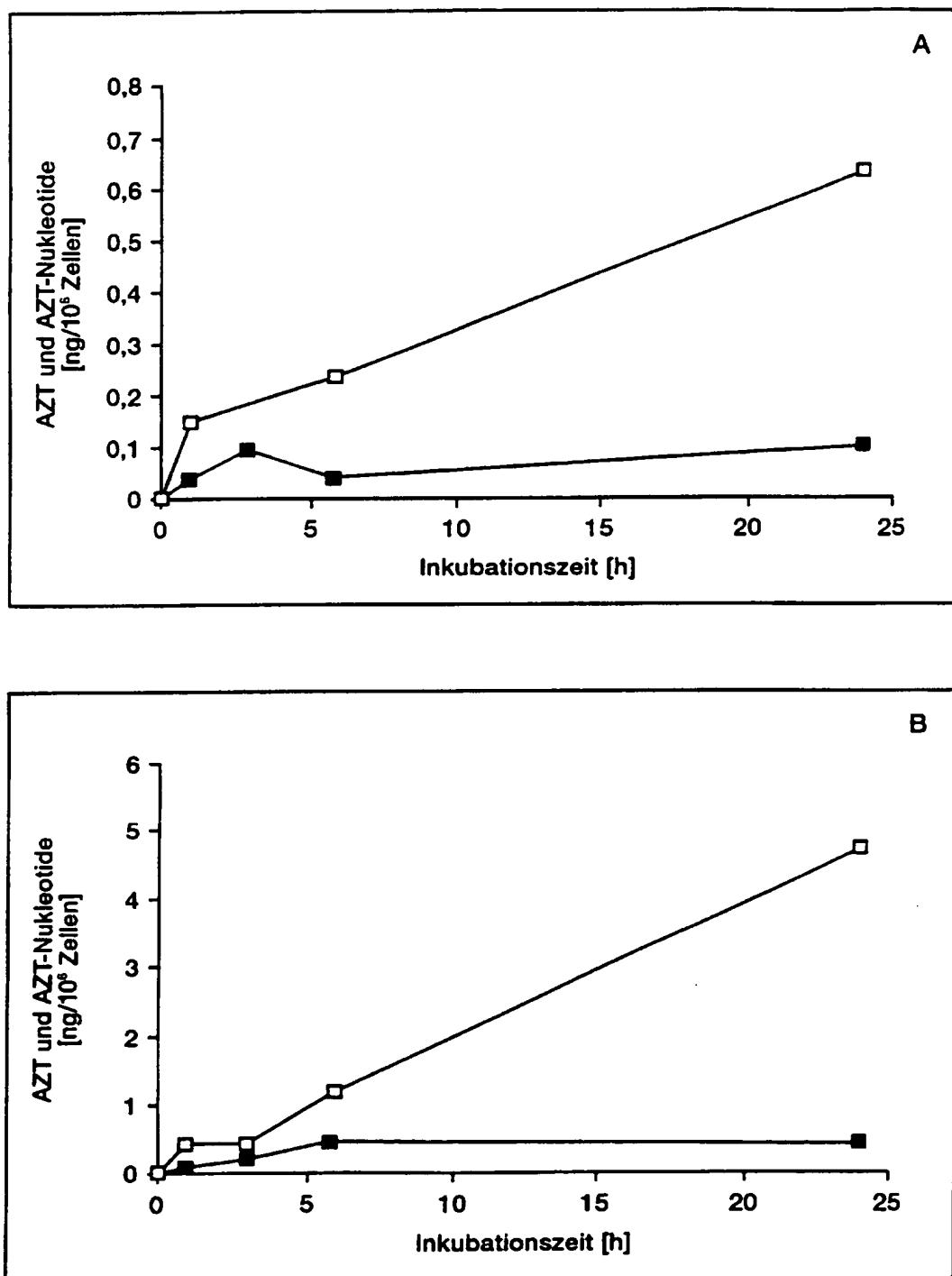


Abb. 7

8/18

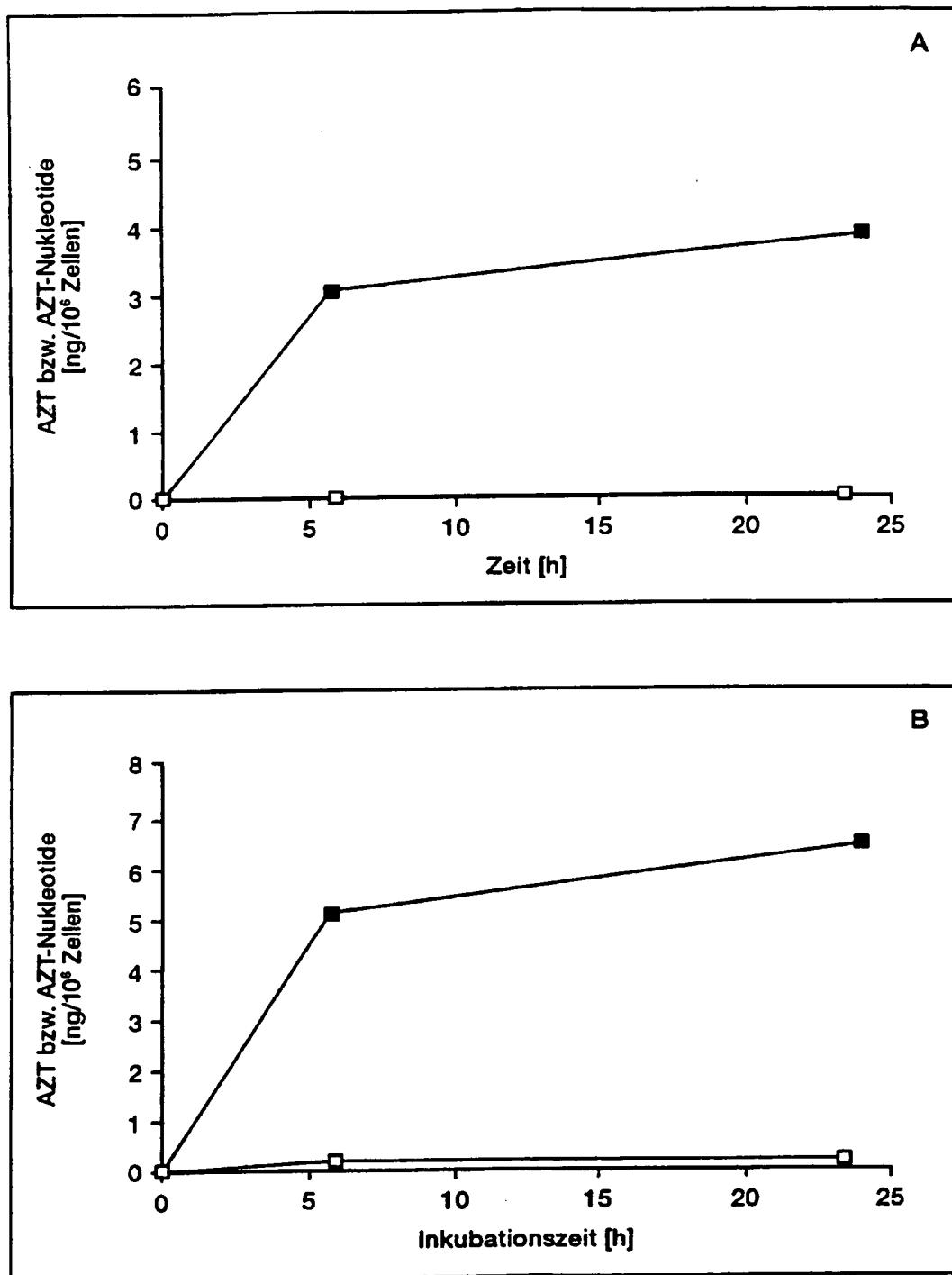


Abb. 8

9/18

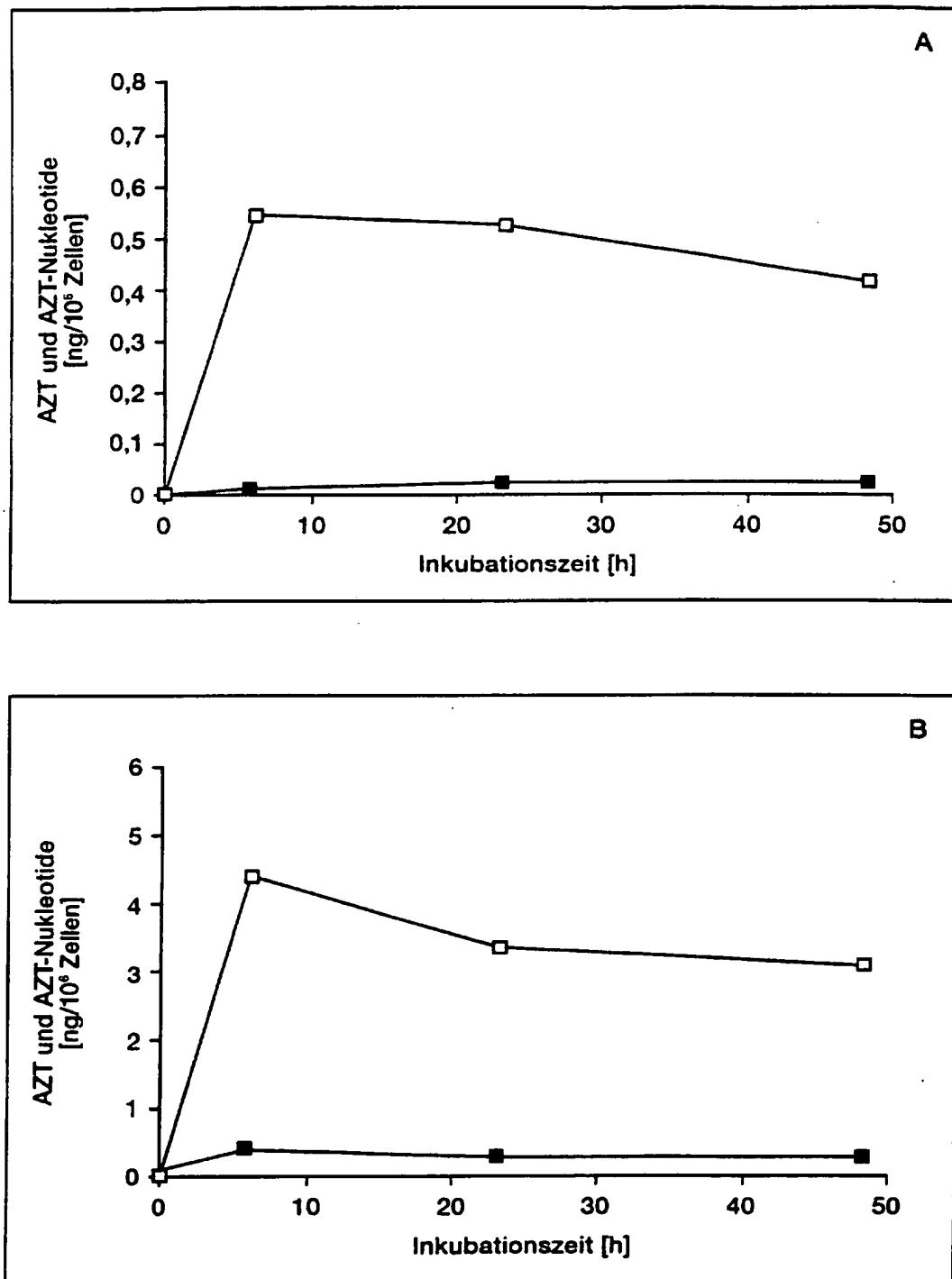


Abb. 9

10/18

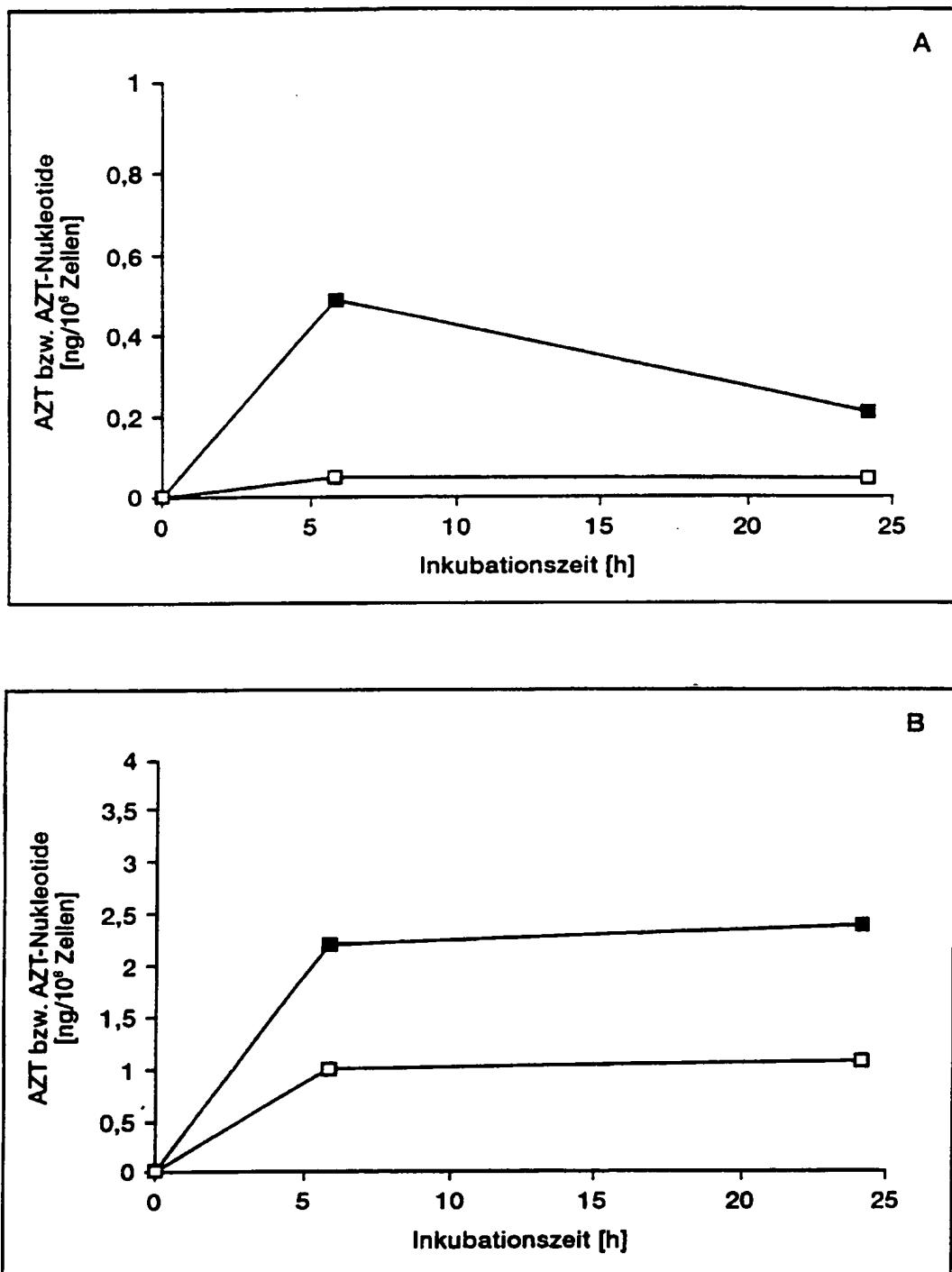


Abb. 10

11/18

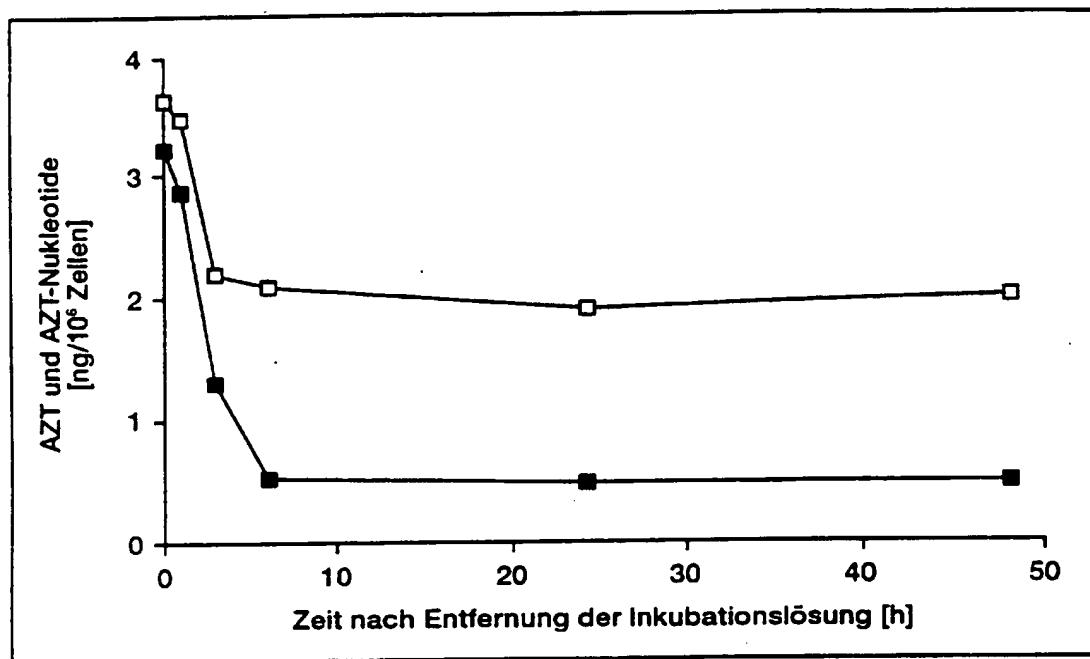


Abb. 11

12/18

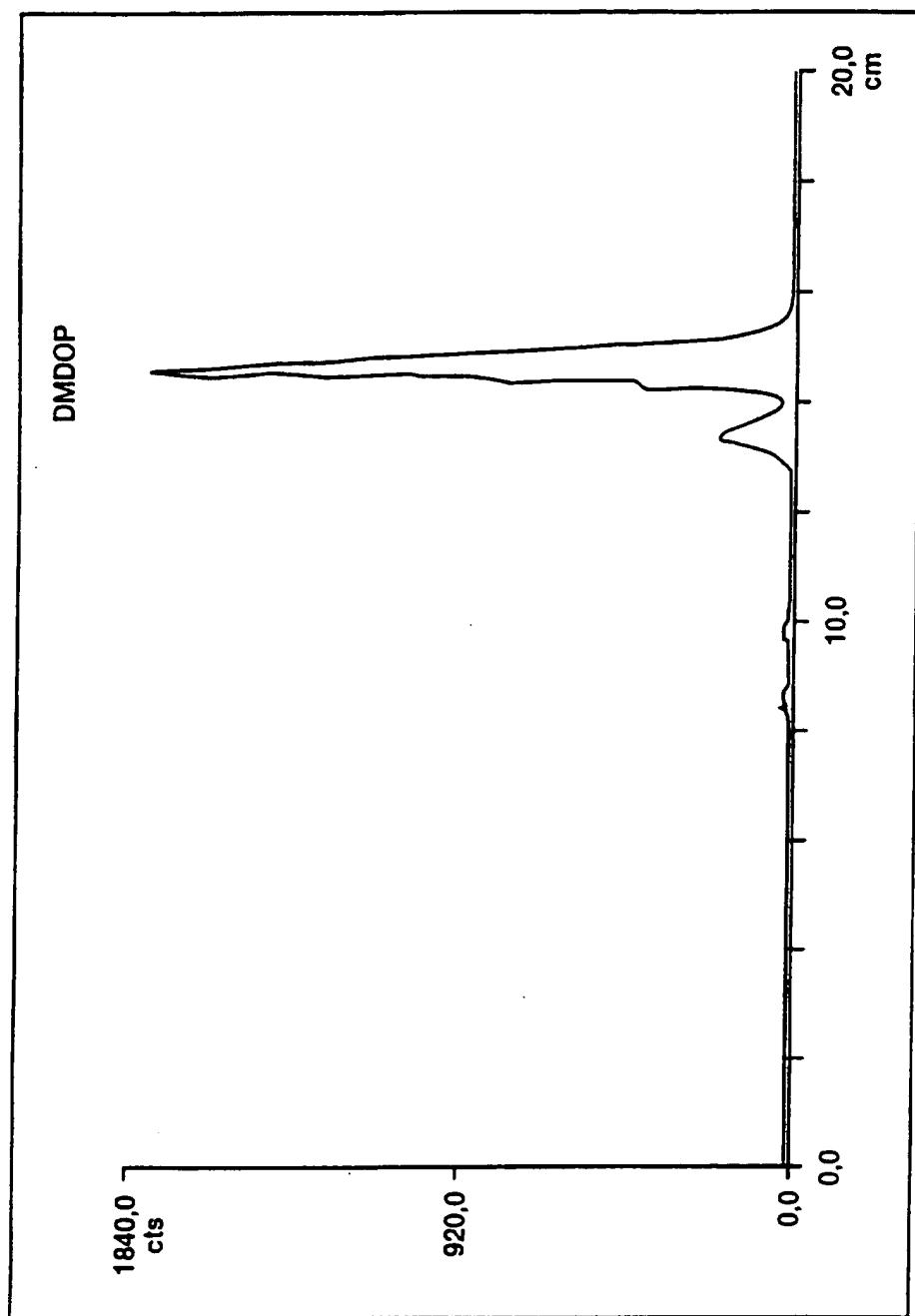


Abb. 12

13/18

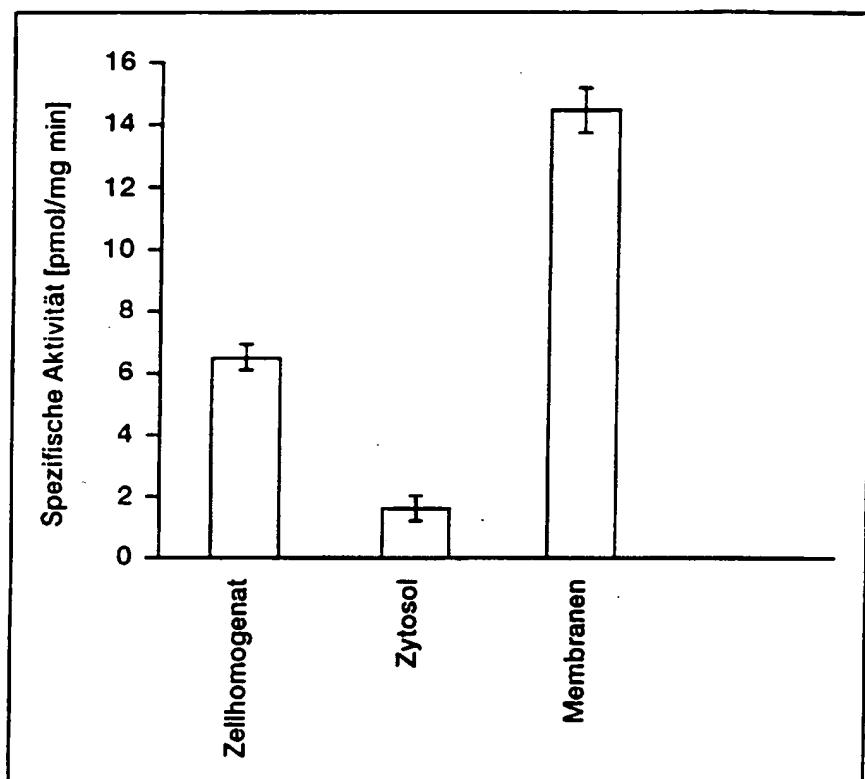


Abb. 13

14/18

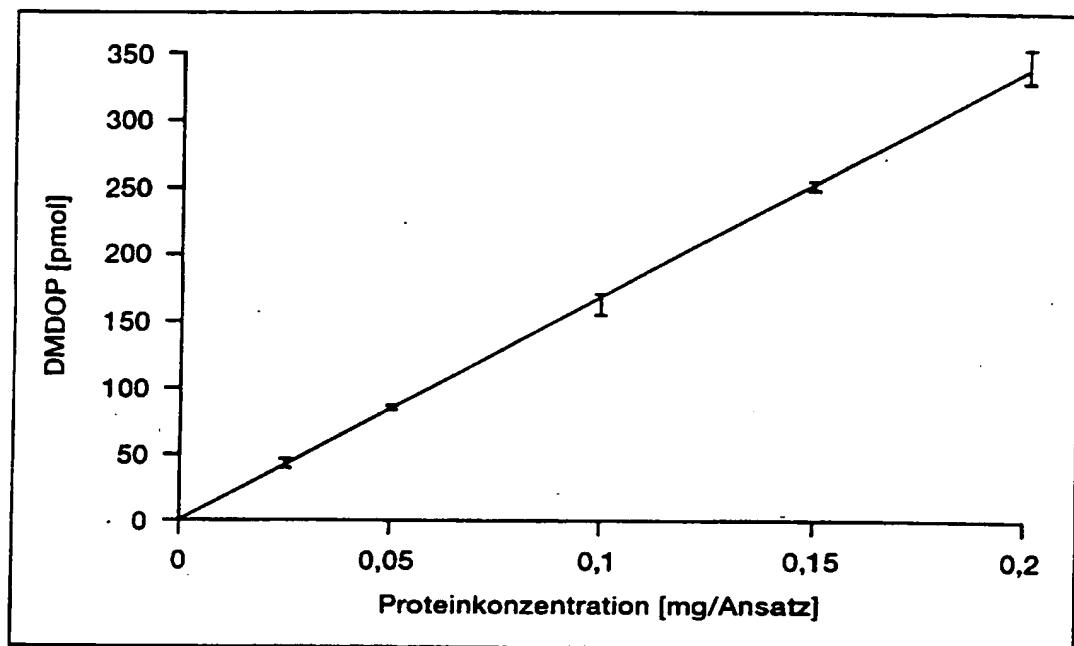


Abb. 14

15/18

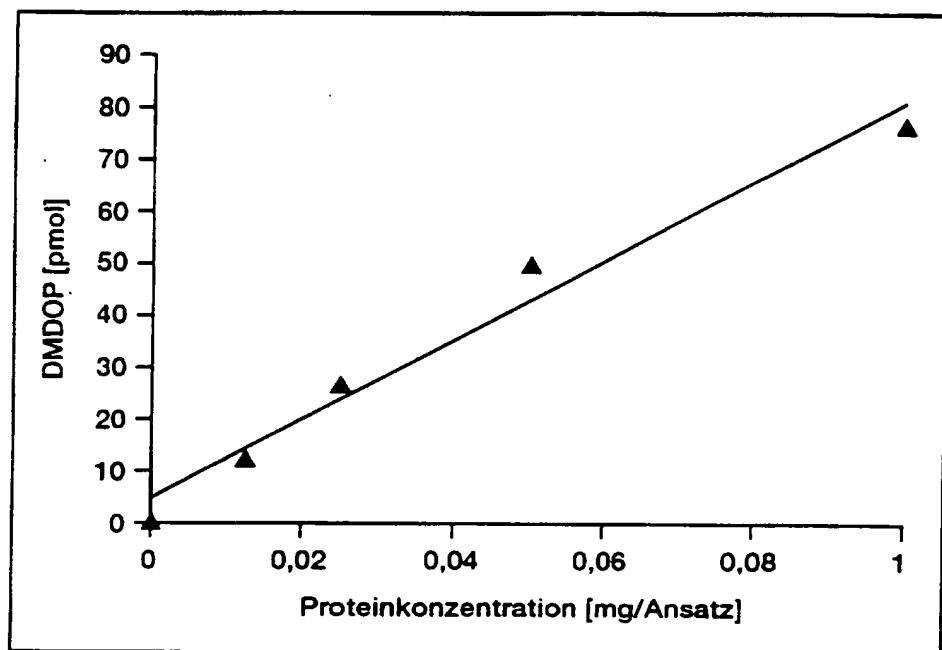


Abb. 15

16/18

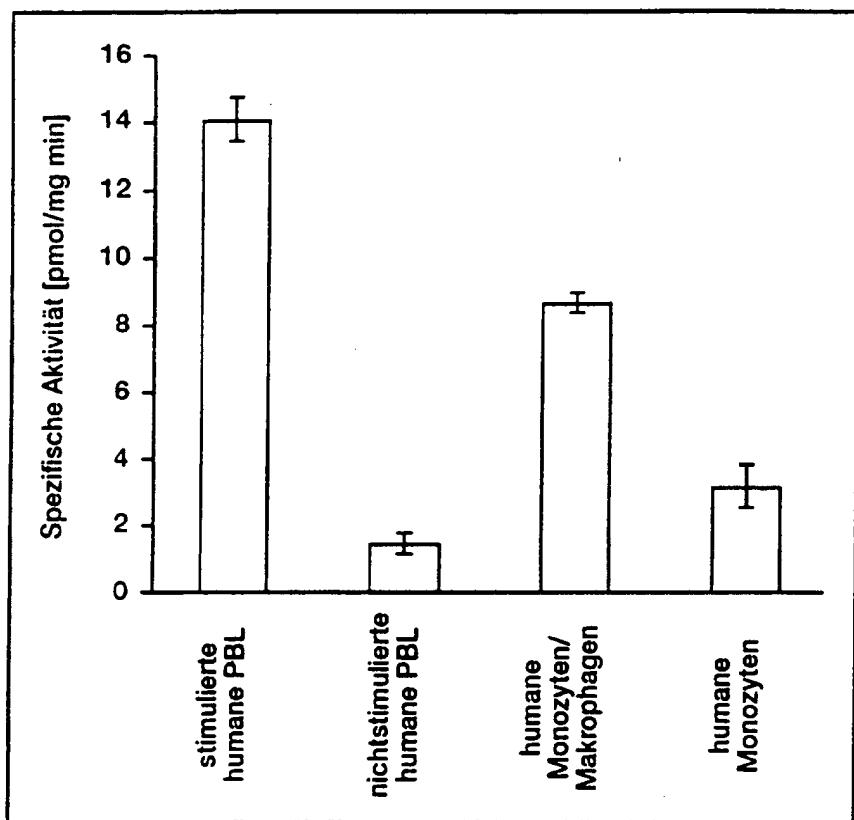


Abb. 16

17/18

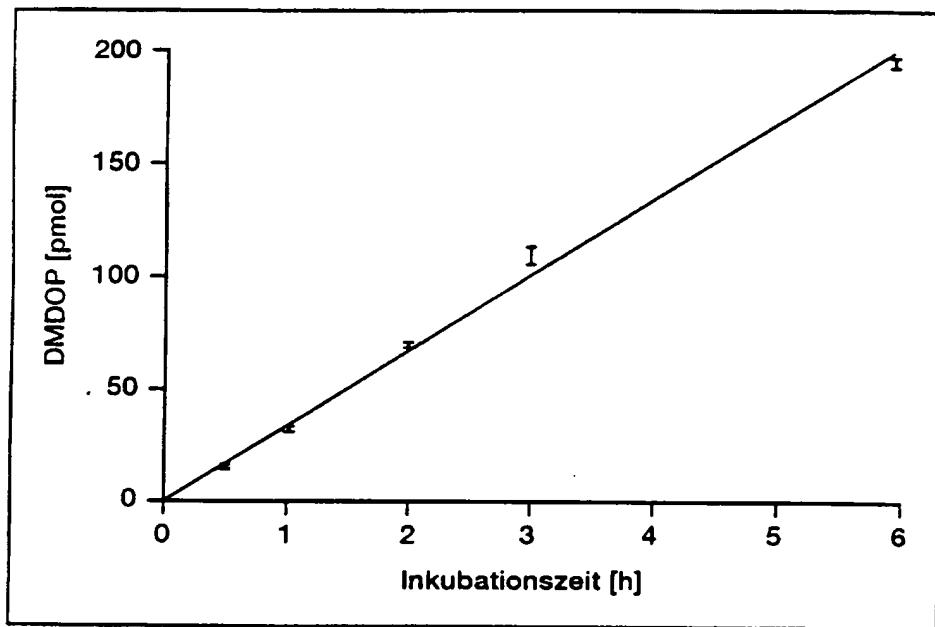


Abb. 17

18/18

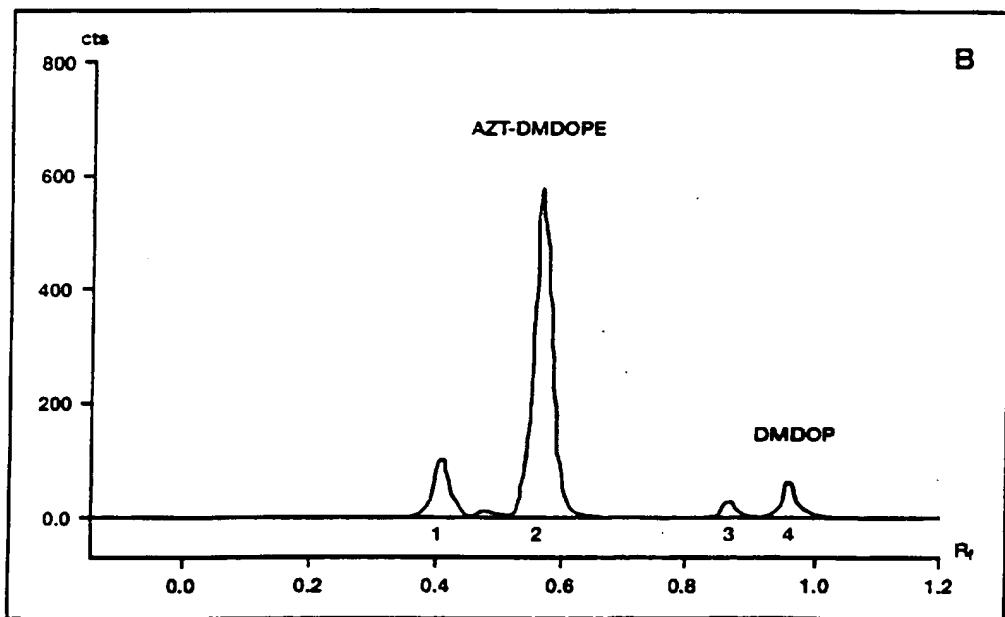
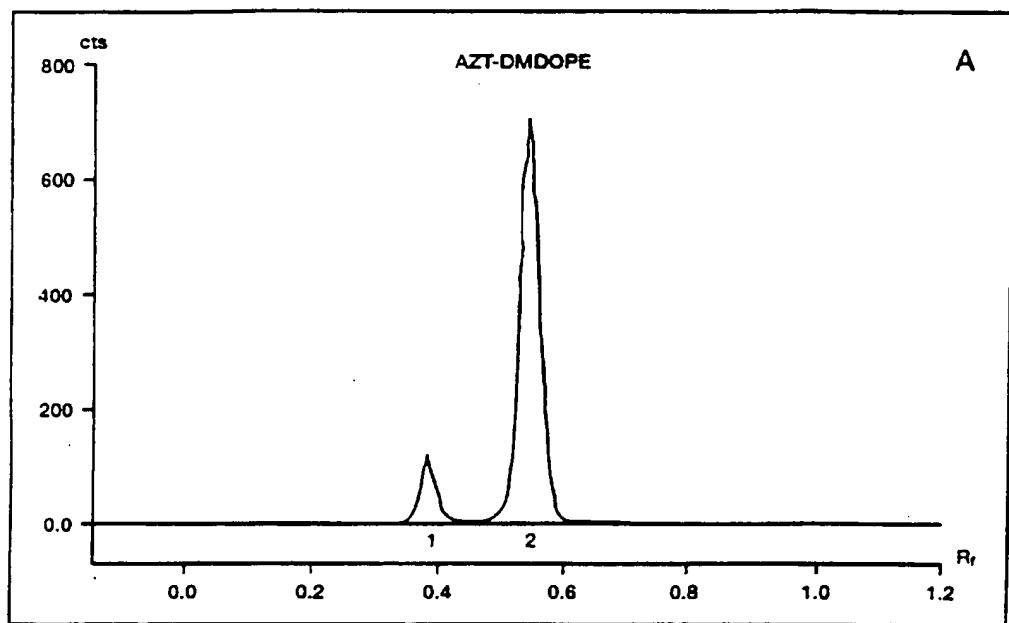


Abb. 18

ERSATZBLATT (REGEL 26)